

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

O papel dos cílios na resposta a níveis elevados de glucose

Rita Simões Marques

Orientador: Professor Doutor Bruno Carmona (ESTeSL)

Orientador: Professora Doutora Maria Helena Antunes Soares (ESTeSL)

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

Lisboa, 2023

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

O papel dos cílios na resposta a níveis elevados de glucose

Rita Simões Marques

Orientador: Professor Doutor Bruno Carmona (ESTeSL)

Orientador: Professora Doutora Maria Helena Antunes Soares (ESTeSL)

Júri

Presidente: Doutora Sofia Bizarro Nolasco da Silva Narciso (ESTeSL)

Arguente: Doutora Helena Susana Pappámikail da Costa Marinho (FCUL)

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

Lisboa, 2023



Mestrado em
Tecnologias
Moleculares

O papel dos cílios na resposta a níveis elevados de glucose

Rita Simões
Marques

2023

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à Escola Superior de Saúde de Lisboa, onde frequentei o mestrado de Tecnologias Moleculares e Saúde e ao Centro de Química Estrutural – Polo da Faculdade de Ciência da Universidade de Lisboa, onde desenvolvi este projeto.

Agradeço aos meus orientadores, Professor Bruno Carmona e Professora Helena Soares por todo o tempo, dedicação e paciência que dedicaram a este projeto, e acima de tudo por todo o conhecimento que partilharam comigo, que tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho e o meu desenvolvimento pessoal.

Obrigada às minhas parceiras de laboratório, Catarina e Mariana, que nunca hesitaram em apoiar e ajudar-me, obrigada por terem facilitado muito a minha vida nestes últimos meses e por terem animado os meus dias no laboratório, a vossa ausência foi notada.

Ao Rodrigo, por teres estado lá sempre, por teres feito tudo o possível para que eu conseguisse dedicar-me a este projeto na totalidade, por teres lidado com todos os dias sim e dias não envolvidos no processo e por me teres mantido sempre à tona.

Aos meus pais e irmã, obrigada por tudo, por estarem sempre lá mesmo estando a uma distância geográfica significativa, obrigada por me terem dotado de todas as ferramentas que eu precisava para estar aqui e tudo o que isso implica, e que eu não poderia ter aprendido em nenhum mestrado, licenciatura ou grau académico existente, só mesmo com vocês.

Financiamento

Centro de Química Estrutural é uma Unidade de Investigação financiada pela FCT através dos projetos UIDB/00100/2020 e UIDP/00100/2020. Institute of Molecular Sciences é um Laboratório Associado financiado pela FCT através do projeto LA/P/0056/2020.

Este trabalho foi financiado pelo Instituto Politécnico de Lisboa IPL/2021/ObeCil_ESTeSL e IPL/2022/WintCilGlu_ESTeSL.

Resumo

As células eucariotas têm a capacidade de montar cílios primários na sua superfície, os quais são críticos para a sinalização e homeostasia celular. Disfunções ciliares estão na base do desenvolvimento de um conjunto de doenças designadas por ciliopatias. Recentemente, foi identificada uma nova variante no gene *ALMS1* numa população de indivíduos obesos caracterizada por uma mutação de substituição c.5552C>T. O gene *ALMS1* codifica para uma proteína que se localiza no centrossoma e no corpo basal, sendo importante para a montagem dos cílios. Mutações neste gene têm sido frequentemente associadas ao desenvolvimento da Síndrome de *Alström*, uma ciliopatia.

Foram objetivos deste trabalho avaliar o papel dos cílios na resposta a níveis elevados de glucose em células hTERT-RPE-1. Foi também nosso objetivo avaliar se a via de sinalização Hippo, que está associada a cílios primários, seria afetada. Para isso, estudámos o impacto nos níveis celulares de um dos membros desta via, a proteína reguladora YAP. Pretendemos ainda avaliar como a variante do gene *ALMS1* c.5552C>T influencia a montagem e função dos cílios, estabelecendo uma relação com o metabolismo da glucose e com os níveis e localização do YAP na célula.

Para alcançar os nossos objetivos montámos um *setup* no qual as células hTERT-RPE-1 foram expostas a diferentes concentrações de glucose (5 mM, 25 mM, e 5 mM glucose+ 20 mM de manitol). A exposição à glucose ocorreu após a indução da montagem de cílios primários por remoção de soro, ou alternativamente, a montagem destas estruturas foi induzida após a exposição à glucose. Observámos que a presença de cílio primário, antes da suplementação com glucose, tem um impacto na regulação dos níveis da YAP, apresentando uma menor tendência para as células progredirem no ciclo celular como analisado por fluxocitometria. Adicionalmente, sabendo que a variante de histona γ -H2AX é um marcador de danos na molécula de DNA e de senescência celular, e que os níveis de YAP estão associados à regulação da senescência, estudámos a localização e a intensidade da marcação por imunofluorescência da γ -H2AX no *setup* acima descrito. Observámos que a presença dos cílios primários antes da exposição à glucose parece aproximar a expressão da γ -H2AX ao observado nas células controlo, mas também diminuir o tamanho e a granularidade celular. Resultados preliminares obtidos com um mutante de *ALMS1* que gera uma proteína truncada criado por CRISPR/Cas 9 revelaram a ausência de microtúbulos acetilados, o que poderá ter impacto na ciliogénese.

Este trabalho suporta a ideia de que o cílio primário funciona como um importante regulador da homeostasia em resposta a níveis elevados de glucose em células hTERT-

RPE-1. Mostra ainda, que a truncagem da proteína ALMS1 pode condicionar a acetilação de microtúbulos, uma observação até aqui desconhecida.

Cílio, ciliopatia, glucose, YAP, ALMS1

Abstract

Eukaryote cells have the ability to assemble primary cilia on their surface, which is critical for cell signaling and homeostasis. Ciliary dysfunctions are the basis for the development of a set of diseases collectively designated by ciliopathies. Recently, a new variant in the *ALMS1* gene characterized by a substitution mutation c.5552C>T was identified in a population of obese individuals. The *ALMS1* gene encodes a protein that localizes at the centrosome and basal body, being important for the assembly of cilia. Mutations in this gene have often been associated with the development of *Alström Syndrome*, a ciliopathy.

The main objectives of this work were to evaluate the role of primary cilia in the response to high glucose levels in hTERT-RPE-1 cells. It was also our objective to evaluate whether the Hippo *signaling* pathway, which is associated with primary cilia, would be affected, studying for this, the impact on the levels of one of the members of this pathway, the regulator YAP. We also assessed how the *ALMS1* c.5552C>T gene variant influences the assembly and function of the cilia, establishing a relationship with glucose metabolism and with the levels and localization of YAP in the cell.

To achieve our objectives, we establish a setup in which hTERT-RPE-1 cells were exposed to different glucose concentrations (5 mM, 25 mM, and 5 mM glucose+ 20 mM of mannitol). Exposure to glucose occurred after induction of the assembly of primary cilia by removal of serum from the culture medium, or alternatively, the assembly of these structures was induced after exposure to glucose. We observed that the assembly of primary cilia before glucose supplementation has an impact on the regulation of YAP levels, with a lower tendency for cells to progress in the cell cycle as analyzed by flow cytometry. On the other hand, knowing that the histone variant γ -H2AX is a marker of DNA damage and cellular senescence, and that YAP levels are associated with senescence regulation, we studied the location of γ -H2AX in the above-described setup. We observed that the presence of the primary cilia, before exposure to glucose, seems to approximate the expression of γ -H2AX to that observed in control cells, as well as a decrease in cell size and granularity. Preliminary results obtained with an *ALMS1* mutant created by CRISPR/Cas 9 that generates a truncated protein revealed that these cells lost the ability to acetylate microtubules, which may have an impact on ciliogenesis.

This work supports the idea that the primary cilia is an important regulator of homeostasis in response to high glucose levels in hTERT-RPE-1 cells. It also shows that the truncation of the *ALMS1* protein may dramatically affect the acetylation of microtubules, a previously unknown observation.

Cilia, ciliopathy, glucose, YAP, ALMS

Índice Geral

1. Introdução	1
1.1. Cílios e ciliopatias	1
1.2. Síndrome de <i>Alström</i> : A função da proteína ALMS1 nas células	6
1.3. Sinalização através do cílio: via Hippo	10
2. Objetivo	17
3. Materiais e métodos	19
3.1. Condições de cultura celular	19
3.2. Microscopia de imunofluorescência	20
3.2.1. Condições experimentais	20
3.2.2. Microscopia de imunofluorescência	22
3.3. Análise de extratos proteicos	24
3.3.1. Condições experimentais	24
3.3.2. Preparação de extratos proteicos	24
3.3.3. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	24
3.3.4. Eletrotransferência de proteínas	25
3.3.5. <i>Western Blot</i>	26
3.4. Citometria de fluxo	26
3.5. Previsão da estrutura tridimensional da proteína variante ALMS1	27
3.6. Sistema CRISPR/Cas9 – Recombinação homóloga	27
3.6.1. Transfeção de hTERT-RPE-1 para mutação direcionada no gene <i>ALMS1</i>	27
3.6.2. Isolamento de clones	29
3.7. Extração de DNA dos clones obtidos e PCR	29
3.8. Eletroforese de DNA em gel de agarose	31
3.9. Análise de dados	31
4. Resultados	33

4.1.	Impacto de diferentes condições de glucose na expressão de YAP em hTERT-RPE-1	33
4.2.	Impacto de diferentes condições de glucose no ciclo celular em hTERT-RPE-1	44
4.3.	Impacto de diferentes condições de glucose na expressão de γ -H2AX em hTERT-RPE-1.....	53
4.4.	Análise bioinformática da sequência genética de <i>ALMS1</i>	65
4.5.	Caraterização de clones transfetados pelo sistema CRISPR/Cas9 para mutação direcionada no gene <i>ALMS1</i>	66
4.6.	Análise bioinformática da sequência genética do mutante <i>ALMS1</i> obtido.....	69
4.7.	Caraterização do mutante obtido pelo sistema CRISPR/Cas9.....	70
5.	Discussão.....	73
6.	Conclusões e perspectivas futuras.....	85
7.	Referências	87

Índice de tabelas

Tabela 3.1. Anticorpos primários e secundários utilizados nos ensaios de microscopia de imunofluorescência, com indicação do animal onde foi produzido, diluição utilizada e fabricante.....	23
Tabela 3.2. Composição do gel resolvente a 10% (m/v) e do gel concentrador a 5% (m/v) de acrilamida, com volume final de 10 mL.	25
Tabela 3.3. Sequência de DNA de cadeia única e do RNA guia utilizados no sistema CRISPR/Cas9.....	29
Tabela 3.4. Composição da mistura utilizada para a amplificação do DNA extraído dos clones produzidos através do sistema CRISPR/Cas9.....	30
Tabela 3.5. Sequências dos primers utilizados na amplificação e sequenciação do DNA extraído dos clones produzidos através do sistema CRISPR/Cas9.	30
Tabela 3.6. Condições utilizadas na amplificação por PCR do DNA extraído dos clones produzidos por CRISPR/Cas9.	31

Índice de figuras

Figura 1.1. Representação da biogénese e estrutura dos cílios.....	4
Figura 1.2. Esquema da estrutura do gene ALMS1 e da proteína correspondente ALMS1.....	7
Figura 1.3. Representação da possível função da proteína ALMS1.....	9
Figura 1.4. Cascata de ativação da via Hippo.....	12
Figura 3.1. Representação esquemática do olho e retina.....	19
Figura 3.2. Representação esquemática das diferentes condições experimentais estudadas em hTERT-RPE-1.....	22
Figura 3.3. Representação esquemática das diferentes condições experimentais estudadas em hTERT-RPE-1.....	24
Figura 3.4. Sistema CRISPR/Cas9 e reparação por homologia direta.....	28
Figura 4.1. Intensidade de YAP em células suplementadas.....	35
Figura 4.2. Intensidade de YAP em células ciliadas antes da suplementação com glucose.....	38
Figura 4.3. Intensidade de YAP em células ciliadas após suplementação com glucose.....	40
Figura 4.4. Representação gráfica da percentagem de YAP nos compartimentos citoplasmático e nuclear da célula.....	41
Figura 4.5. Intensidade de YAP nas hTERT-RPE-1 nas diferentes condições experimentais.....	43
Figura 4.6. Análise por <i>Western Blot</i> dos níveis relativos de YAP celular em extratos totais de hTERT RPE-1.....	44
Figura 4.7. Representação do ciclo celular em hTERT-RPE-1.....	49
Figura 4.8. Representação gráfica do tamanho de hTERT-RPE-1.....	52
Figura 4.9. Representação gráfica da granularidade de hTERT-RPE-1.....	53
Figura 4.10. Intensidade de γ -H2AX em hTERT-RPE-1.....	57
Figura 4.11. Intensidade de γ -H2AX em hTERT-RPE-1.....	61
Figura 4.12. Representação gráfica da média do número de focos de γ -H2AX em células hTERT RPE-1.....	63
Figura 4.13. Representação gráfica da percentagem de núcleos com focos de γ -H2AX em células hTERT-RPE-1.....	64
Figura 4.14. Previsão das estruturas tridimensionais dos primeiros 2500 resíduos de aminoácidos da proteína ALMS1.....	66
Figura 4.15. Imagens de microscópio de fase invertida representativas de células após 48 horas em cultura.....	68

Figura 4.16. Amplificação da região alvo do sistema CRISPR/Cas9 do clone 1 com o <i>primer v1</i> e posteriormente com o <i>primer v2</i>	68
Figura 4.17. Eletroferograma representativo da sequenciação de <i>Sanger</i> . Em destaque a inserção de timina no nucleótido 5541.....	69
Figura 4.18. Estrutura tridimensional da variante ALMS1 c.5541_5542insT.	70
Figura 4.19. Imagens de microscópio de fase invertida representativas de células 24 horas após privação de soro.....	71
Figura 4.20. Microscopia de imunofluorescência na variante ALMS1 c.5541_5542insT e em hTERT-RPE-1.....	72

Lista de abreviaturas

ALMS – Síndrome de *Alström*

ARL113B - Proteína 13B semelhante ao fator de ribosilação de ADP

AURKA - Aurora A Cinase

BBS - *Bardet-Biedl*

CAS9 - *CRISPR-associated protein 9*

CRISPR - repetições palindrômicas curtas regularmente espaçadas e agrupadas (de *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)

DAPI - 4,6-diamidino-2-fenilindole

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA - Ácido desoxirribonucleico (de *desoxirribonucleic acid*)

DPBS - Duplecco's PBS

ECL - Quimioluminescência potenciada (de *enhanced chemiluminescence*)

EDTA - Ácido etileno diamino tetra-acético

FBS - soro bovino fetal (de *fetal bovine serum*)

Foz - *fat aussie*

FSC - *Forward scatter*

GLUT - Transportador de glucose

H2AX - Histona da família H2A

HDAC6 - Histona desacetilase 6

HEF1 - *Human enhancer of filamentation 1*

Hh – Via Hedgehog

HM - *Hidrophobic motif*

HRP - Peroxidase de rábano (de horseradish peroxidase)

hTERT - *Human telomerase reverse transcriptase*

IFT – Transporte intraflagelar (de *Intraflagellar Transport*)

IRS1- Substrato 1 do recetor de insulina (de *Insulin receptor substrate 1*)

LATS1/2 - *Large tumor suppressor kinase 1*

MAP4K - *Mitogen-activated protein kinase*

MST1/2 - *Mammalian Sterile 20-Like Kinase*

NPHP – Nefronoftise

Pb – Pares de bases

PBS - Tampão de fosfatos salino (de *phosphate-buffered saline*)

PCR - Reação em cadeia do polimerase (de *polymerase chain reaction*)

RNA - Ácido ribonucleico (de *ribonucleic acid*)

RPE-1 - Linha celular epitelial do pigmento da retina (de *retinal pigment epithelial*)

SDS - Dodecilsulfato de sódio (de *sodium dodecyl sulphate*)

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (de *SDS-poliacrilamide gel electrophoresis*)

sgRNA – RNA guia (de *single guide RNA*)

SSC – Side scatter

TAE – Tampão tris-acetato-EDTA

TAZ - *Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*

TEAD - *TEA domain family member*

TEMED - N, N, N, N-tetrametiletilenodiamina

Tween 20 - Polioxietileno(sorbitan)monolaurato

YAP - Yes-associated protein 1

1. Introdução

1.1. Cílios e ciliopatias

As células são a unidade básica dos organismos, por isso são capazes de manter e integrar uma variedade de diferentes funções que permitem a sua sobrevivência, crescimento e constante adaptação ao ambiente em mudança (Azevedo et al., 2008). Há uma multiplicidade de distintos recetores celulares que recebem sinais do ambiente exterior, tais como hormonas, fatores de crescimento, neurotransmissores ou citocinas, e estes são responsáveis pela regulação de variadas funções celulares induzindo a célula a dividir, ajustar o seu metabolismo, diferenciar, mover ou morrer. Esta sinalização é fundamental para as células e, conseqüentemente, para os tecidos e órgãos funcionarem corretamente (Ribeiro et al., 2008).

As células eucariotas têm a capacidade de montar organelos complexos na sua superfície que são críticos para a sinalização celular, designados por cílios, que concentram sinais do meio ambiente funcionando como antenas. Estes complexos compartimentos celulares são constituídos por microtúbulos que se projetam para o exterior da superfície celular e desempenham funções sensoriais, sinalizadoras e de motilidade, sendo fundamentais na embriogénese, polaridade e diferenciação celular, e, portanto, essenciais para a homeostasia de células e tecidos (Anvarian et al., 2019; Satir & Christensen, 2007).

Os cílios podem ser categorizados em dois grupos, cílios primários e cílios móveis. Os cílios móveis são responsáveis pela promoção do movimento celular ou do fluxo de fluidos e pensa-se que tenham também funções sensoriais. Exemplos destes cílios no corpo humano são as células epiteliais do trato respiratório, onde os cílios são importantes para reter partículas e bactérias, impedindo-as de entrar no trato respiratório profundo, e para criar um fluxo de muco para excretar estas partículas. Da mesma forma, os ependimócitos que revestem os ventrículos do cérebro desempenham um papel crítico na homeostase do fluido cerebrospinal, no metabolismo cerebral e na eliminação dos resíduos do cérebro. O trato reprodutivo feminino também é revestido de cílios que permitem a migração de oócitos e embriões para o útero e, ainda o flagelo dos espermatozoides que permite o seu movimento característico (Ishikawa & Marshall, 2011; Satir & Christensen, 2007).

Os cílios primários são fundamentais em processos sensoriais, nomeadamente, em resposta a estímulos mecânicos (fluxo de fluídos, forças mecânicas) (Ley & AbouAlaiwi, 2019; Nauli et al., 2013) e químicos (variações osmóticas, de pH, oxigénio, luz) (Anvarian et al., 2019; Hildebrandt et al., 2011) e em processos de sinalização, que são fundamentais para o controlo da divisão, diferenciação e sobrevivência celular (Satir & Christensen, 2007).

Apesar de desempenharem diferentes funções nas células, tanto o cílio móvel como o cílio primário têm a mesma estrutura básica que consiste num axonema que deriva do corpo basal que está ancorado na membrana plasmática, e são delimitados por uma membrana especializada que está em continuidade com a membrana plasmática (Reiter & Leroux, 2017).

Como o nome indica, a estrutura base do cílio é o corpo basal, que deriva de um centríolo-mãe do centrossoma. O centrossoma é o principal centro organizador de microtúbulos e é fundamental na organização de actina em células animais. Este é constituído por dois centríolos, o centríolo-mãe e o centríolo-filho, e uma matriz de proteínas designada matriz pericentriolar. Os centríolos são constituídos por 9 tripletos de microtúbulos, e cada tripleto é constituído por um microtúbulo A completo, composto por 13 protofilamentos, um microtúbulo B e um microtúbulo C, estes dois incompletos e compostos por 10 protofilamentos. Cada protofilamento é constituído por subunidades de α e β -tubulina, que formam o heterodímero de tubulina, unidade básica da constituição dos protofilamentos (Bettencourt-Dias & Glover, 2007; Jana, 2021). Tipicamente, o cílio primário é formado em células pós-mitóticas (G1 ou G0) em resposta a sinais específicos de desenvolvimento ou do meio ambiente. Como resultado destes sinais, vesículas derivadas do complexo de *Golgi*, designadas vesículas pré ciliares acoplam-se à extremidade distal do centríolo-mãe, que apresenta estruturas especializadas, tais como apêndices subdistais e apêndices distais (Chen et al., 2021; Ishikawa & Marshall, 2011; Satir & Christensen, 2007). Estas vesículas fundem-se originando uma vesícula ciliar maior e rica em ARL13B, constituintes da cascata Rab8-Rab11 e outros componentes que são fundamentais na diferenciação do centríolo-mãe em corpo basal (**Erro! A origem da referência não foi encontrada.** A, B) (Chen et al., 2021).

Posteriormente, o centrossoma migra em direção à membrana celular onde a vesícula ciliar se funde, e onde os apêndices distais e subdistais permitem a ancoragem do corpo basal à membrana celular e consequente extensão dos microtúbulos do axonema ciliar para o exterior da célula (Figura 1.1. B) (Keeling et al., 2016). Antes da extensão do axonema é formada uma zona de transição constituída por *Y-links*, fibras em forma de Y, que demarcam a transição entre os tripletos de microtúbulos do corpo basal e os dupletos do axonema. Estas fibras ligam os dupletos de microtúbulos do axonema à membrana ciliar e permitem criar uma barreira entre o cílio e o resto da célula e um controlo apertado da entrada e saída de proteínas e outros compostos para o organelo (Anvarian et al., 2019; Gonçalves & Pelletier, 2017).

O axonema é então constituído por 9 dupletos de microtúbulos estáveis que são montados a partir da zona distal do corpo basal. Cada duplete é constituído por um

microtúbulo A completo e um microtúbulo B incompleto. Para ocorrer extensão do cílio é necessário importar α e β -tubulina do citoplasma para a extremidade do cílio, através do transporte intraflagelar (Ishikawa & Marshall, 2011; Satir & Christensen, 2007; Tobin & Beales, 2009).

O transporte intraflagelar é um sistema que permite o transporte de componentes específicos tanto em direção à extremidade do cílio, anterógrado, como em direção ao corpo da célula, retrógrado. Este transporte é fundamental para a montagem e manutenção da estrutura ciliar e é composto por dois grandes complexos, IFT-A e IFT-B (Figura 1.1. E). O complexo IFT-A é constituído por 6 proteínas (IFT43, 122A, 122B, 139, 140, 144) e é fundamental no transporte retrógrado, promovido por um complexo motor de dineína-2, importante no transporte de moléculas de sinalização recebidas ou de recetores que já não são necessários, para transmissão de sinais para o núcleo ou para degradação, respetivamente. O complexo IFT-B é constituído por 11 proteínas (IFT20, 27, 46, 52, 57, 72, 74, 80, 81, 88, 172) e participa no transporte anterógrado, promovido por um complexo motor de cinesina-2, sendo fundamental na montagem do cílio e no transporte de outras moléculas para a extremidade do cílio. Apesar dos complexos estarem associados a transporte em diferentes direções, estes migram ao longo do axonema em conjunto. Há também um complexo de 8 proteínas BBS, o BBSoma, que funciona como um adaptador IFT, principalmente associado à exportação ciliar de proteínas de sinalização. A Síndrome de *Bardet-Biedl* demonstra a importância deste complexo, pois a mutação de proteínas do BBSoma leva a alterações no funcionamento do IFT dando origem a esta síndrome (Anvarian et al., 2019; Ishikawa & Marshall, 2011).

Quando a extensão do cílio está completa continua a haver incorporação de tubulina na extremidade do cílio, mantendo um turnover constante que permite a manutenção do tamanho do cílio. A α e β -tubulina dos microtúbulos sofre diversas modificações pós-traducionais, como por exemplo, acetilação, glutamilação, glicação e destirosinação, que são fundamentais para a estabilização dos microtúbulos e montagem do cílio (Gaertig & Wloga, 2008).

Os cílios móveis apresentam ainda um par central de microtúbulos, e por isso são comumente referidos como cílios "9+2", estes também possuem projeções radiais que ligam os dupletos centrais aos exteriores, braços de dineína internos e externos, e complexos nexina-dineína, todos estes requeridos para gerar o seu movimento

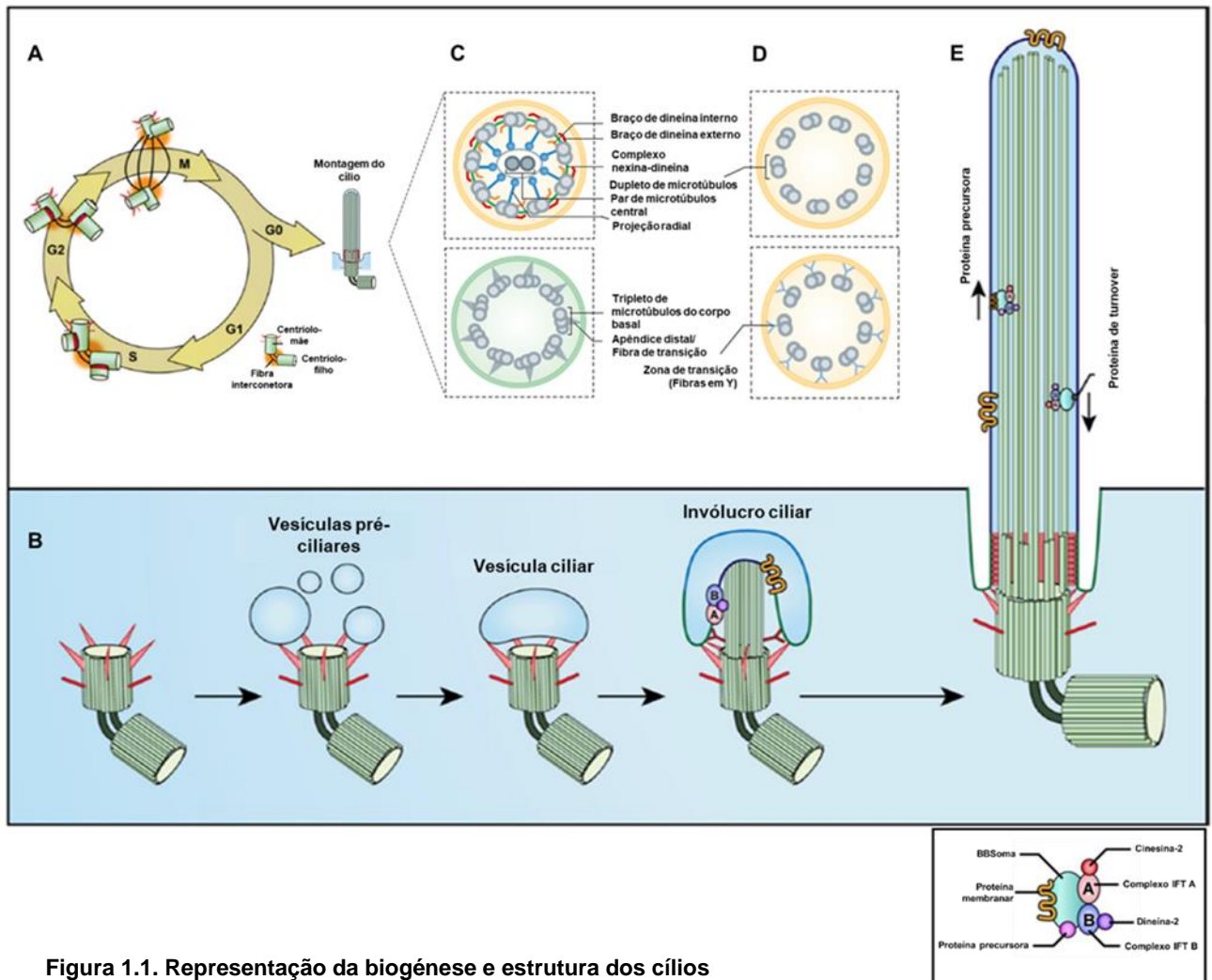


Figura 1.1. Representação da biogénese e estrutura dos cílios

(A) Tipicamente o cílio alonga-se a partir de um corpo basal que deriva de um centríolo-mãe do centrosoma, em fase G0/G1. (B) A ciliogénese inicia-se em resposta a estímulos específicos que levam à migração de vesículas pré-ciliares derivadas do *Golgi* que se associam ao centríolo-mãe e eventualmente formam uma vesícula ciliar maior que permite a maturação do centríolo-mãe em corpo basal e a migração para a membrana celular. (C) O corpo basal é constituído por nove tripletos de microtúbulos, com apêndices distais/fibras de transição que ancoram o corpo basal à base da membrana ciliar e apêndices subdistais. O axonema apresenta nove dupletos de microtúbulos. Os cílios móveis apresentam, para além dos dupletos de microtúbulos, um par central de microtúbulos, braços de dineína, complexos nexina-dineína e projeções radiais que lhe conferem movimento. (D) Os cílios primários apresentam um axonema apenas com dupletos externos. Acima do corpo basal encontra-se a zona de transição, que liga os dupletos de microtúbulos do axonema à membrana ciliar através de fibras em Y. (E) O sistema de transporte intraflagelar é fundamental na montagem e manutenção do cílio. O transporte anterógrado é feito pelo complexo IFT-B associado ao motor de cinesina-2, em conjunto com o complexo IFT-A e motor de dineína inativos, com as proteínas precursoras direcionadas à extremidade ciliar e o BBSoma. O transporte retrógrado é feito pelo complexo IFT-A associado ao motor de dineína-2, em conjunto com o complexo IFT-B e motor de cinesina-2 inativos, com as proteínas de *turnover* direcionadas ao corpo celular e o BBSoma. Adaptado de Chen et al., 2021 e Reiter & Leroux, 2017.

Figura 1.1. C). Ao contrário dos cílios móveis, os cílios primários não possuem o par central de microtúbulos nem proteínas auxiliares de movimento, na maioria dos casos, sendo referidos como cílios "9+0" (Figura 1.1. D). Uma exceção a esta estrutura clássica são os cílios do nó primitivo que apresentam estrutura "9+0", mas possuem braços de dineína e apresentam movimento rotacional. Estes cílios estão envolvidos na formação do fluxo nodal que determina a assimetria direita-esquerda em vertebrados (Satir & Christensen, 2007).

A membrana ciliar apresenta uma composição significativamente diferente da membrana plasmática devido à compartimentação característica do cílio, que é mantida pela existência da zona de transição e de fibras de transição (apêndices distais) que permitem o controlo da passagem de componentes para o interior e exterior do cílio. A composição ciliar é também controlada pelo transporte ativo de moléculas presentes no citoplasma ou de proteínas derivadas do *Golgi*, que sofrem modificações pós-traducionais de forma a serem direcionadas especificamente para o corpo basal, onde aumentam a sua concentração e são depois transportadas pelos complexos IFT. Todos estes mecanismos de controlo de tráfego de moléculas enriquecem o cílio com diferentes complexos que permitem a deteção e transdução de sinais de forma eficaz, tais como recetores, canais de iões, proteínas efetoras e fatores de transcrição (Anvarian et al., 2019; Song et al., 2018).

Os cílios primários podem ser desmontados antes da mitose, permitindo a libertação do centríolo para formar o fuso mitótico. A fase exata de reabsorção dos cílios varia de célula para célula, ocorrendo algumas vezes na fase S, enquanto noutras ocorre na transição G2/Mitose. O comprimento, montagem do axonema e reabsorção dos cílios é controlado por várias cinases e através do IFT, coordenando o ciclo celular com a ciliogénese (Ishikawa & Marshall, 2011; Satir & Christensen, 2007). Algumas das proteínas associadas à reabsorção do cílio são a proteína Pitchfork e HEF1, que interagem com a Aurora A Cinase (AURKA), que por sua vez catalisa a fosforilação e ativa a histona desacetilase 6 (HDAC6), responsável pela desacetilação da tubulina e instabilidade dos microtúbulos. Também a PLK1, uma cinase de fase G2/M, está associada à desmontagem do cílio, pois ativa a cinesina KIF2A, que durante a ciliogénese é degradada, e quando ativada promove a despolimerização de microtúbulos. Da mesma forma a cinesina KIF24 é ativada pela NEK2, cinase expressa na fase S e G2, que leva à despolimerização dos microtúbulos (Chen et al., 2021; Plotnikova et al., 2009).

Diferentes genes codificam proteínas associadas a estruturas ciliares como o corpo basal, zona de transição, IFT, centrossoma ou fuso mitótico. Visto que os cílios podem

estar presentes em virtualmente todas as células, uma mutação num destes genes pode levar alterações na função e estrutura ciliar e a fenótipos sistémicos afetando diferentes órgãos. As ciliopatias englobam um conjunto de doenças associadas a alterações ciliares e podem ser classificadas como motoras ou não-motoras/primárias (Anvarian et al., 2019; Hildebrandt et al., 2011; Tobin & Beales, 2009). As ciliopatias motoras estão muitas vezes associadas a infertilidade, hidrocefalia e deficiências respiratórias, sendo um exemplo a discinesia ciliar primária. Quanto às ciliopatias primárias, apresentam características em comum como obesidade, diabetes *mellitus* tipo 2, polidactilia, défice cognitivo, *situs inversus*, doença hepatobiliar, quistos renais, degeneração da retina, defeitos no tubo neuronal e anomalias esqueléticas. Como estão associadas a alterações no cílio primário alguns destes fenótipos poderão ser consequência da desregulação de vias de sinalização e sensoriais relacionadas com o cílio. São exemplos destas ciliopatias a Síndrome de *Bardet-Biedl* (BBS), de *Senior-Löken* (SNLS), de *Meckel* (MKS), de *Joubert* (JBTS), Oro-facial-digital tipo I (OFD1), *Ellis van Creveld* (EVC), de *Jeune* (JATD) e de *Alström* (ALMS) (Tobin & Beales, 2009).

Recentemente foram identificadas novas variantes em genes relacionados a ciliopatias numa população de indivíduos obesos, nomeadamente no gene *ALMS1*, *BBS1*, *CCDC28B* e *TMEM67* (Ginete et al., 2021). Neste trabalho decidimos focar-nos no estudo da Síndrome de *Alström* e perceber melhor o impacto funcional de variantes no gene *ALMS1* e como estas contribuem para o desenvolvimento de alterações metabólicas através da disfunção dos cílios.

1.2. Síndrome de *Alström*: A função da proteína *ALMS1* nas células

A Síndrome de *Alström* é uma doença hereditária recessiva muito rara, causada pela mutação no gene *ALMS1*. A maioria dos indivíduos são homocigóticos ou heterocigóticos compostos, isto é, cada progenitor doa um alelo com mutações em diferentes locais do gene (Marshall et al., 2015). Esta síndrome tem uma incidência de 1/1.000.000 na Europa e América do Norte, podendo aumentar em regiões com elevada consanguinidade. Atualmente foram identificados no total cerca de 1000 casos ([Orphanet](#)), número que tem vindo a aumentar significativamente nos últimos anos, em provável relação com o maior conhecimento e diagnóstico da patologia. Os sintomas da Síndrome de *Alström* resultam da alteração na expressão do gene *ALMS1*, que codifica uma proteína localizada nas extremidades proximais dos centríolos e no corpo basal, com possível papel na formação e manutenção dos cílios primários (Hearn et al., 2005; Kang, 2021; Waters & Beales, 2011).

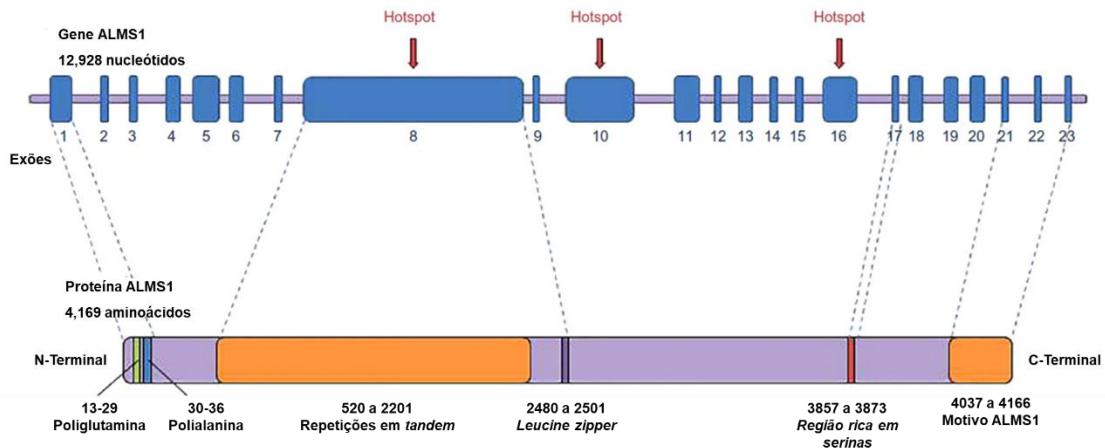


Figura 1.2. Esquema da estrutura do gene ALMS1 e da proteína correspondente ALMS1.

Os exões 8,10 e 19 são hotspots para mutações no gene ALMS1. A proteína tem com 4169 resíduos de aminoácidos. Adaptado de *Castro-Sánchez et al., 2015*.

Os doentes com Síndrome de *Alström* à semelhança de outras ciliopatias têm um espectro de características que pode afetar diversos órgãos, sendo as principais características obesidade infantil, resistência à insulina, distrofia retiniana, hipoacusia neurossensorial bilateral, cardiomiopatia dilatada com insuficiência cardíaca congestiva, doença hepática e renal e fibrose em diversos órgãos. Os fenótipos metabólicos são especialmente graves e cerca de 95% dos doentes desenvolvem obesidade infantil nos primeiros 5 anos de vida, apresentando resistência à insulina, hiperinsulinémia, hiperleptinémia, hiperlipidémia, levando a diabetes *mellitus* tipo 2 (Kang, 2021; Paisey et al., 2003). O grau de resistência à insulina é muito mais grave em pacientes com variantes no *ALMS1* em comparação a outras causas genéticas de obesidade, como a BBS, indicando que esta afeta um ponto crucial do mecanismo que mantém a sensibilidade à insulina, como a função das células β -pancreáticas ou a sinalização de insulina. Em contrapartida doentes com ALMS não parecem apresentar neuropatia característica da diabetes, indicando que esta síndrome possa proteger de alguma forma contra a neuropatia (Castro-sánchez et al., 2015; Girard & Petrovsky, 2011; Kang, 2021). Alterações endócrinas são comuns, tais como hipotireoidismo, hipogonadismo em homens, bem como hiperandrogenismo em mulheres, levando a que a maioria dos doentes sejam inférteis (Paisey et al., 2003). O gene *ALMS1* localiza-se no braço curto do cromossoma 2 (2p13) e possui 23 exões, codificando uma proteína de 461 kDa, com 4169 resíduos aminoácidos. O exão 1 codifica uma região de poliglutamina entre o aminoácido 13 e 29 e entre o aminoácido 30 e 36 uma região de polialanina. O exão 8 codifica cerca de 40% da proteína, e entre os resíduos de aminoácidos 520 e 2201 existe uma região de 34 repetições em *tandem* imperfeitas de 45 a 50 resíduos de

aminoácidos, seguida de um *leucine zipper* entre os resíduos de aminoácidos 2480 e 2501, que sugere um papel importante da proteína em interações proteína-proteína ou proteína-DNA. Existe ainda uma região rica em serinas e um motivo conservado na extremidade C-terminal, que parece ser fundamental na função da proteína (Figura 1.2.) (Girard & Petrovsky, 2011; Marshall et al., 2015).

A maioria das variantes descritas neste gene encontram-se se a jusante do exão 7, principalmente no exão 8 (49%), 10 (17%) e 16 (19%), que são considerados *hotspots* para mutações de *ALMS1*. A maioria das mutações associadas à Síndrome de *Alström* são *nonsense* ou *frameshift*, normalmente inserções e deleções que levam ao encurtamento da proteína, não tendo a porção C-terminal da proteína, indicando que esta terá um importante papel na função celular. Mutações *missense* são mais raras e o seu impacto clínico ainda não é claro, pois a sequência da proteína é mantida, mas a consequência funcional da troca dos resíduos de aminoácidos ainda não é conhecida (Marshall et al., 2015).

A função exata da proteína *ALMS1* e os mecanismos moleculares que esta envolve ainda não são totalmente conhecidos, mas alguns estudos teorizam sobre a sua função, sendo que o facto de se localizar nos centríolos, sugere funções associadas à organização de microtúbulos, tráfego de vesículas, controlo do ciclo celular e divisão, e montagem e função do corpo basal e do cílio primário (Andersen et al., 2003; Hearn et al., 2005; Zulato et al., 2011), podendo torná-la fundamental para processos sensoriais e de sinalização associados ao cílio (Girard & Petrovsky, 2011; Marshall et al., 2015; Shenje et al., 2014).

Pensa-se que à semelhança da Síndrome de *Bardet-Biedl* também a Síndrome de *Alström* esteja relacionada com alterações no transporte intraflagelar, nomeadamente a *ALMS1* pode ligar-se a proteínas no complexo de *Golgi* sendo fundamental no seu transporte para a base do cílio e para formar complexos de IFT para transporte de carga dentro do cílio, revelando a sua importância na manutenção de vias de sinalização associadas ao cílio (Figura 1.3.) (Collin et al., 2005; Girard & Petrovsky, 2011). A proteína *ALMS1* parece interagir também com proteínas associadas ao citoesqueleto, maioritariamente isoformas de α -actinina, podendo estar associada à endocitose e exocitose de vesículas (Collin et al., 2012), sendo que em modelos de ratinho *ALMS1*^{-/-} verifica-se acumulação de vesículas de rodopsina na retina (Collin et al., 2005) e ratinhos *fat aussie* (*ALMS1 foz/foz*) com a *ALMS1* truncada, apresentam hipertrofia das ilhotas pancreáticas (Arsov et al., 2006), que é uma característica em doentes com Síndrome de *Alström* que pode dever-se à acumulação de vesículas de insulina nas células β pancreáticas. A *ALMS1* relaciona-se ainda com o tráfego endossomal de transferrina (Collin et al., 2012), Notch1 (Leitch et al., 2014) e GLUT 4 (Favaretto et al.,

2014), este último um transportador de glucose dependente de insulina, abundante nas membranas celulares do músculo esquelético, cardíaco e tecido adiposo. Estas alterações no transporte de insulina e de GLUT4 poderão justificar em parte como a proteína ALMS1 mutada contribui para o desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo 2 nos doentes com Síndrome de *Alström* (Romano et al., 2008).

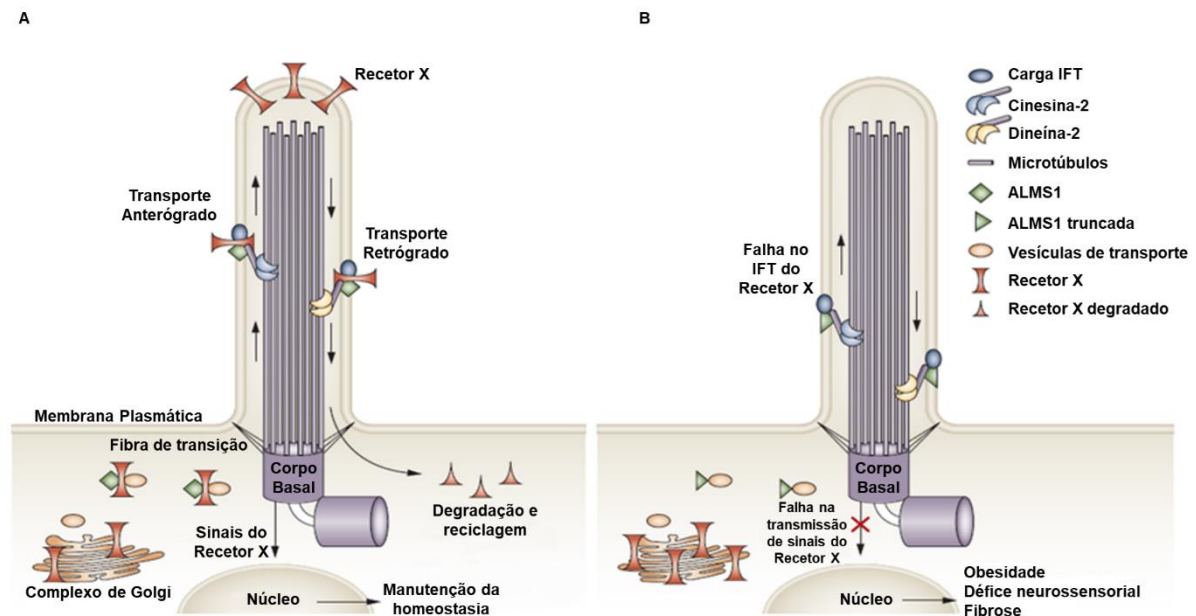


Figura 1.3. Representação da possível função da proteína ALMS1.

(A) A proteína ALMS1 pode estar envolvida no transporte intracelular de vesículas do complexo de *Golgi* para outras regiões da célula, nomeadamente para o cílio primário, e no transporte intraflagelar, sendo fundamental na regulação de transmissão de sinais do cílio para o núcleo e manutenção da homeostasia. **(B)** Mutantes de *ALMS1* originam proteínas com estrutura e função alterada que impede o transporte de receptores e eventualmente outros componentes para o cílio, resultando no comprometimento sinalização celular e no desenvolvimento de fenótipos caraterísticos da Síndrome de *Alström*. Adaptado de Girard & Petrovsky, 2011.

Pensa-se também que a ALMS1 tenha um papel fundamental na diferenciação de diferentes tipos de células, nomeadamente na adipogénese, sendo que existe uma elevada expressão de mRNA *ALMS1* em pré-adipócitos (3T3-L1) que vai diminuindo progressivamente com a maturação em adipócitos. Os pré-adipócitos apresentam cílios primários transientes durante a diferenciação e alterações na expressão de ALMS1 durante esta fase podem influenciar a função deste cílio primário e contribuir para o desenvolvimento de obesidade (Marion et al., 2008; Romano et al., 2008). Em cardiomiócitos de ratinhos com *knockdown* do gene que codifica a ALMS1 verificou-se também um comprometimento da diferenciação, sendo que existe um aumento da densidade e número de células, potencialmente relacionado com a incapacidade de bloquear o ciclo celular (Shenje et al., 2014). Em fibroblastos de pacientes de ALMS

verificou-se um aumento do tempo do ciclo celular e uma regulação negativa de genes de progressão do ciclo celular e de replicação (Zulato et al., 2011). A espermatogênese também parece estar comprometida em ratinhos *fat aussie*, parecendo estar especialmente condicionado o alongamento dos espermátídios, um processo dependente de microtúbulos e relacionado com o momento da formação do axonema dos espermatozoides (Arsov et al., 2006).

A perda de ALMS1 está associada também à perda de coesão entre os centríolos o que pode dificultar a estabilidade do corpo basal e posterior formação do cílio (Knorz et al., 2010). Estudos em células do epitélio renal de ratinhos (Li et al., 2007) e em hTERT-RPE1 (Graser et al., 2007) com supressão da expressão de ALMS1 mostram uma atrofia no cílio primário destas células. Outro estudo realizado em hTERT-RPE1 (Álvarez-Satta et al., 2021) demonstra cílios primários com tamanho aumentado e alterações na sua morfologia, com ângulos e enrolamento atípicos. Em contrapartida, um estudo em fibroblastos mostra formação de cílios aparentemente normal, sugerindo que a ALMS1 seria mais importante para a função ciliar que para a sua morfologia (Hearn et al., 2005). Um estudo em ratinhos *foz*, mostrou a ausência do corpo basal em neurónios hipotalâmicos indicando perda de cílios primários nestes neurónios. O cílio primário no hipotálamo parece ter um papel importante na regulação de sinais de saciedade, sendo que a sua desregulação pode levar à hiperfagia, característica em doentes de ALMS, que contribui para o agravamento da obesidade (Castro-sánchez et al., 2015; Girard & Petrovsky, 2011; Heydet et al., 2013; Yang et al., 2021).

Ainda que não sejam claros os mecanismos pelos quais a ALMS1 contribui para a ciliogénese e manutenção do cílio, sabe-se que a sua alteração compromete o funcionamento do cílio e, potencialmente, de algumas vias de sinalização a ele associadas, contribuindo para o desenvolvimento da Síndrome de *Alström*.

1.3. Sinalização através do cílio: via Hippo

Como mencionado anteriormente, o controlo do cílio primário é influenciado por e influencia uma multiplicidade de vias de sinalização, tais como as vias de sinalização *Hedgehog* (Hh) e *Wnt*, que estão associadas ao desenvolvimento embrionário e à organização de tecidos, estando componentes de ambas as vias associadas ao transporte intraflagelar e à ciliogénese. Para além destas funções, estas vias relacionadas com o cílio têm sido associadas a funções metabólicas, sendo que tanto a via Hh como a *Wnt* são inibidoras da adipogénese e estão associadas ao metabolismo da glucose e a diferentes vias de sinalização de insulina. Cada vez mais evidências

apontam para uma relação entre anomalias de sinalização nestas vias e as ciliopatias (Satir & Christensen, 2007; Song et al., 2018).

Outra via de sinalização associada ao cílio é a via Hippo. Esta via é responsável pelo controlo da proliferação e tamanho celular, embriogénese, diferenciação, sobrevivência, reparação e homeostasia celular. Sabe-se que esta via pode ser regulada por vários estímulos a montante tanto biomecânicos como bioquímicos, o que é fundamental para que a célula não se divida em resposta a estímulos físicos sem as condições de oxigénio, nutrientes e energia necessárias para o fazer (Ibar & Irvine, 2020; Zheng & Pan, 2019).

A via de sinalização Hippo desencadeia uma cascata de ativação de cinases. A cinase MST1/2 é trans-autofosforilada ou ativada pela fosforilação mediada pela cinase TAOK. Um dímero de SAV1 forma um heterotetrâmero com duas MST1/2 permitindo a ativação e localização de MST1/2 na membrana. A MOB1/2 liga-se aos locais fosforilados da MST1/2 e facilita a sua interação com a LATS1/2, que catalisa a fosforilação do seu domínio HM e leva à autofosforilação da LATS1/2, proteínas da família MAP4K, também parecem contribuir para a fosforilação do domínio HM. A MOB1/2 permite ainda alteração conformacional LATS1/2 fundamental para a progressão da sinalização. Esta via culmina na fosforilação e inativação do complexo YAP/TAZ (Yes-associated protein 1/Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) que, ou se liga ao complexo 14-3-3, levando ao seu sequestro citoplasmático ou é encaminhado para degradação, impedindo a sua entrada para o núcleo e a ativação da transcrição dos genes-alvo. Esta via é regulada por um mecanismo de feedback negativo, sendo que a MST1/2 ativada recruta um complexo de fosfatases STRIPAK PP2A que inativa a MST1/2 (Figura 1.4). Por outro lado, quando a via Hippo é inativada, o YAP/TAZ encontra-se desfosforilado, podendo entrar para o núcleo e interagir com fatores de transcrição (Karaman & Halder, 2018; Totaro et al., 2018; Zheng & Pan, 2019).

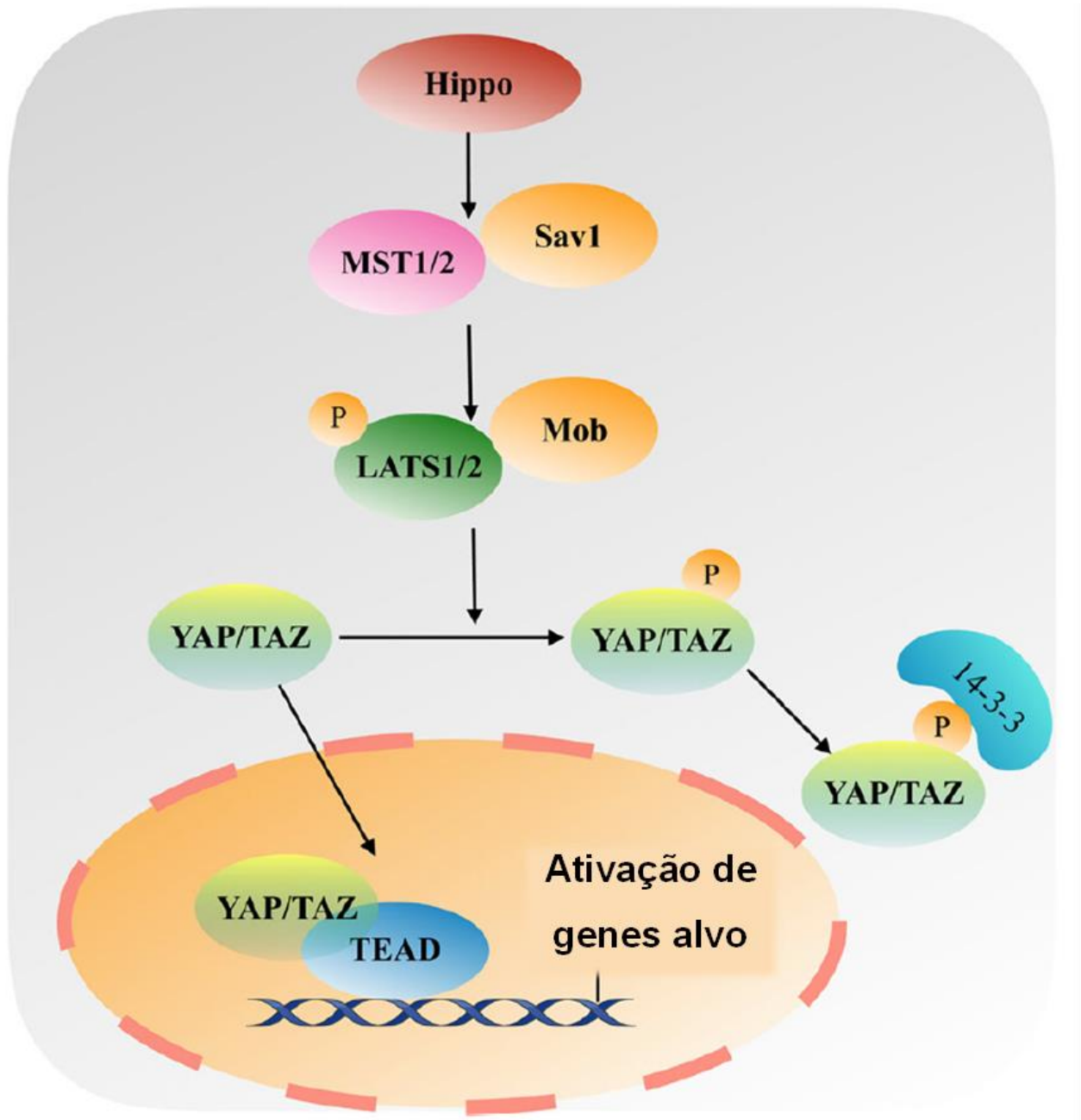


Figura 1.4. Cascata de ativação da via Hippo.

A cinase MST1/2 é ativada por fosforilação mediada pela TAOK ou autofosforilada. A SAV1 forma um heterotetrâmero com as cinases MST1/2, que são ativadas e dirigem-se para a membrana plasmática. A MOB1 liga-se às regiões fosforiladas da MST1/2 e permite a interação entre MST1/2 e LATS1/2, que é então ativada, catalisando a fosforilação do complexo YAP/TAZ, levando à sua retenção citoplasmática e eventual degradação. Adaptado de *Zhang et al.*, 2018.

Quando o complexo YAP/TAZ entra no núcleo interage com diversos fatores de transcrição, não se ligando diretamente ao DNA, sendo assim um modulador indireto de

expressão genética. Desta forma, o seu impacto na célula vai variar consoante os fatores de transcrição a que se associa. Mais frequentemente o complexo YAP/TAZ interage com os fatores de transcrição TEAD (1,2,3 e 4) (*TEA domain family member 1,2,3 e 4*), que por sua vez interagem com o DNA levando à transcrição de genes de proliferação e sobrevivência celular como ciclina E (regulador de ciclo celular), diap1 (inibidor de morte celular) e microRNA *bantam* (pro-proliferativo e anti-apoptótico) e genes relacionados com migração celular, organização de matriz extracelular e de citoesqueleto. O complexo YAP/TAZ pode ainda interagir com a p73, a ERBB4, a EGR-1, a RUNXs e as SMADs (M. K. Kim et al., 2018; Zheng & Pan, 2019).

Esta é considerada a via Hippo canónica, mas pensa-se que vias alternativas possam contribuir para o funcionamento da mesma, sendo que alterações num dos elementos da cascata de sinalização não leva necessariamente à sua disfunção, indicando que existem outras moléculas a contribuir para a sua manutenção, ainda que não seja algo totalmente conhecido (Zheng & Pan, 2019).

A via Hippo está descrita como sendo fundamental na mecanotransdução, recebendo estímulos mecânicos do exterior, tais como forças de estiramento, fluxo de fluídos ou tensão do citoesqueleto, e adaptando a sinalização interna em função desses estímulos. Esta via pode então ser influenciada pelo contacto célula-célula e densidade celular, sendo que um maior número de domínios de membrana plasmáticas como junções aderentes, junções de oclusão e desmossomas, e proteínas associadas, tais como, Crumbs, E-caderina, Angiomotina, α e β -Catenina, normalmente promovem a ativação da via Hippo e inibem a ativação do complexo YAP/TAZ (Misra & Irvine, 2018; Rausch & Hansen, 2020). O aumento da rigidez da matriz extracelular está associado a um aumento da transmissão de forças mecânicas através de adesões focais e integrinas na membrana celular e a uma reorganização e aumento da tensão do citoesqueleto de F-actina. Este fenómeno leva à ativação de cinases de adesão focal (FAK) que ativam a tirosina cinase SRC e, por sua vez, leva à inativação da LATS1/2 e migração do YAP/TAZ para o núcleo. Uma vez no núcleo, a YAP promove a transcrição de genes que codificam componentes das adesões focais (Rausch & Hansen, 2020; Totaro et al., 2018). Está descrito também que a redução de proteínas da família das espectrinas, que incluem a α -actinina, α -espectrina, β -espectrina, distrofina e utrofina, leva a uma reorganização atípica do citoesqueleto de F-actina e conseqüentemente à ativação anormal do YAP/TAZ (Fletcher et al., 2015; Nicolas et al., 2014).

A via Hippo é também fortemente influenciada pela polaridade apicobasal, existindo um conjunto de proteínas na região apical da célula que estão diretamente relacionadas com a regulação da via, nomeadamente NF2, Kibra e PTPN14, que são supressoras tumorais e regulam a Hippo e as proteínas Crumbs e proteínas semelhantes à

angiomotina que interagem entre si e ativam a via Hippo e inibem o complexo YAP/TAZ (Misra & Irvine, 2018; Varelas et al., 2010; Zheng & Pan, 2019). A MOB1 é uma proteína central na regulação da via Hippo que tem a capacidade de ligar e ativar MST1/2 e LAST1/2, e foi descrita como um fator crítico na definição da polaridade celular em *Tetrahymena*, criando mais um elo entre o estabelecimento de polaridade celular e a ativação da via Hippo (Soares et al., 2019; Tavares et al., 2012).

Pensa-se que o complexo YAP/TAZ e os cílios primários se regulem reciprocamente de uma forma negativa. Na presença de cílio primário, o complexo MST1/2-SAV1 localiza-se no corpo basal, interagindo com diversas proteínas associadas ao corpo basal como a NPHP e potencialmente ALMS1, onde se pensa que esta tenha um papel fundamental no controlo da carga que entra no cílio e no favorecimento da ciliogénese. As proteínas NPHP4 e NPHP9, associadas à ciliopatia nefronoftise, inibem a via Hippo, através da inibição da LATS1/2 e consequente ativação do complexo YAP/TAZ. Ainda que não tenham sido identificadas interações entre a via Hippo e a ALMS1 é plausível que pela sua proximidade, esta possa ter impacto ou ser influenciada por esta via de sinalização (Rausch & Hansen, 2020; Wheway et al., 2018).

A ciliogénese também é suprimida por fatores de remodelação de actina, como LIMK2 e TESK1, que aumentam a tensão do citoesqueleto e inibem o tráfego de vesículas em parte pela ativação do complexo YAP/TAZ. Por outro lado, a citocalasina D, leva à instabilidade da actina e consequente retenção citoplasmática de YAP/TAZ, induzindo a ciliogénese e formação de cílios maiores (J. Kim et al., 2015; Rausch & Hansen, 2020). Para além disto, MST1/2 interage com e catalisa a fosforilação da AURKA, potenciando a ciliogénese por outra via, pois inibe a interação de AURKA com a HDAC6, que quando interagem formam um complexo de desmontagem do cílio. Nesta situação a via Hippo está ativada, sendo que MST1/2 está fosforilado e o complexo YAP/TAZ também, ficando retido no citoplasma. No caso inverso, quando o complexo YAP/TAZ é translocado para o núcleo são expressos AURKA e PLK1, fatores de desmontagem do cílio primário. Isto revela que a via Hippo e, especificamente a cinase MST1/2 e o complexo YAP/TAZ, têm um papel fundamental no controlo da ciliogénese (M. Kim et al., 2014; Rausch & Hansen, 2020; Wheway et al., 2018).

À semelhança das outras vias de sinalização associadas ao cílio, também a via Hippo parece estar relacionada ao metabolismo celular. A desregulação da via Hippo e do YAP têm sido maioritariamente associados a condições celulares atípicas como a carcinogénese, sendo que nestas situações parece haver uma hiperativação de YAP no núcleo, que atua como um oncogene, pois leva à expressão de diversos genes fundamentais na mudança de fosforilação oxidativa da glucose para glicólise aeróbia, proliferação desregulada das células, transição epitelial-mesenquimal e promoção de

entrada anormal de glucose para as células (Lei et al., 2008; Totaro et al., 2018; Zhang et al., 2018). Nestas situações, a atividade do complexo YAP/TAZ é regulada pela disponibilidade de glucose no meio, em elevadas concentrações de glucose parece haver menor fosforilação do YAP e aumento da sua atividade nuclear, em contrapartida em meios sem glucose ou com inibição da glicólise observa-se a sua retenção citoplasmática (DeRan et al., 2014; Enzo et al., 2015; Mo et al., 2015; Wang et al., 2015). A fosfofrutocinase, enzima fundamental na glicólise parece potenciar a formação de complexos YAP-TEAD no núcleo e a transcrição de genes-alvo, como HMMR, TK1, CTGF e ANKRD1 (Enzo et al., 2015). A via Hippo relaciona-se ainda com a via de sinalização insulina/fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (Straßburger et al., 2012), que leva ao aumento da localização nuclear do complexo YAP/TAZ e é fundamental no crescimento celular dependente de insulina. Uma vez no núcleo o YAP permite a transcrição de genes que também controlam o metabolismo da glucose, nomeadamente transportadores de glucose GLUT1, GLUT2 (Cox et al., 2018) e GLUT3 (Wang et al., 2015), e parece também regular a expressão do substrato 1 do recetor de insulina (IRS1), que promove a translocação de GLUT4 para a membrana (Hwang et al., 2019).

A hiperativação do complexo YAP/TAZ também está associada ao desenvolvimento de fibrose nos tecidos, característica em doentes com Síndrome de *Alström*. O aumento tensão no citoesqueleto em consequência de maior deposição de matriz extracelular pelos fibroblastos leva à migração da YAP para o núcleo, o que contribui para a expressão de genes que agravam este cenário de fibrose.

A Síndrome de *Alström* é uma doença monogénica associada a defeitos ciliares e potencialmente relacionada com disrupção de vias de sinalização associadas ao cílio, tendo como consequência fenótipos de obesidade, resistência à insulina, diabetes *mellitus* tipo 2 e fibrose em vários órgãos. Assim, esta doença constitui um modelo monogénico para estudo destas patologias não só para os indivíduos com Síndrome de *Alström*, mas também para outras formas de obesidade e diabetes, sendo importante compreender os diversos mecanismos subjacentes à sua patogénese. Consequentemente, no presente trabalho pretendemos estudar o papel que os cílios têm na resposta a elevados níveis de glucose em células epiteliais da retina, estabelecendo uma relação com a via de sinalização Hippo e com alterações na proteína ALMS1 que comprometem o seu normal funcionamento.

2. Objetivo

É concebível que variantes em genes que conduzam a defeitos ciliares possam estar associadas ao desenvolvimento de fenótipos metabólicos através de diferentes mecanismos, nomeadamente através da disrupção de vias de sinalização associadas ao cílio.

Para perceber melhor como a função ciliar e as vias de sinalização estão interligadas, decidimos estudar a presença de YAP em diferentes condições de suplementação com glucose na linha celular de epitélio da retina, hTERT-RPE-1.

Em paralelo com o modelo em células epiteliais da retina normais, pretendemos ainda avaliar como variantes da ALMS1, nomeadamente a variante c.5552C> T ALMS1 identificada por Ginete et al., 2021, influenciam a montagem e função dos cílios, tentando estabelecer uma relação com o metabolismo e com os níveis e localização de YAP na célula.

3. Materiais e métodos

3.1. Condições de cultura celular

Para realizarmos os ensaios experimentais usámos a linha celular de células epiteliais pigmentadas da retina humana, imortalizada com *Telomerase Reverse Transcriptase* (hTERT-RPE-1) (ATCC, EUA). As células hTERT-RPE-1 formam uma monocamada epitelial altamente polarizada na parte mais profunda do olho, que assenta na membrana de *Bruch*, esta camada é essencial para o desenvolvimento e função dos fotorreceptores que se localizam logo acima das hTERT-RPE-1, estando envolvidas na fagocitose do segmento externo do fotorreceptor, reciclagem de componentes do ciclo visual e controlo do transporte de nutrientes, água e iões (Figura 3.1.). A degeneração desta camada de células da retina precede a degeneração dos fotorreceptores, levando ao desenvolvimento de distrofia retiniana característica em variadas ciliopatias, nomeadamente na Síndrome de *Alström*. Diversos genes associados a ciliopatias estão associados à função normal das hTERT-RPE-1, tais como BBS8, IFT88 e CEP290, indicando que a disfunção do cílio está na base da disfunção destas células. (Gómez et al., 2022; May-Simera et al., 2018; Sun et al., 2021). A utilização desta linha celular tem como vantagens a fácil visualização do citoesqueleto e o facto de não ser tumoral, pelo que quaisquer resultados observados deverão ser causados pelas alterações induzidas *in vitro* e não por mutações características da linha celular. Todas estas características levaram à escolha das células hTERT-RPE-1 para estudo do papel dos cílios em resposta a elevados níveis de glucose.

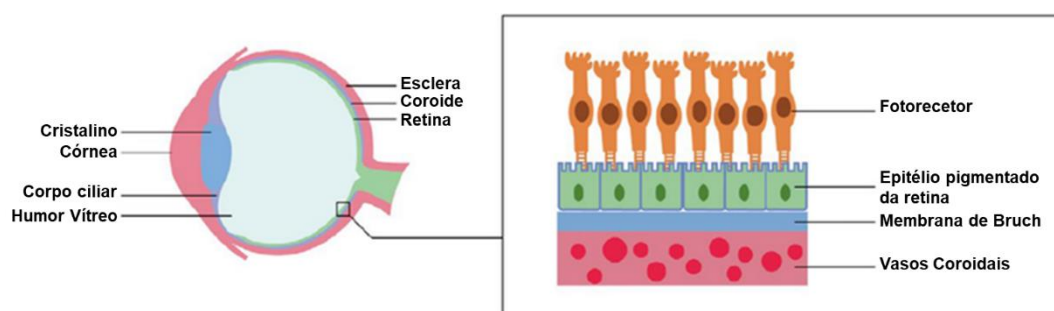


Figura 3.1. Representação esquemática do olho e retina

A retina localiza-se na parte posterior do olho. As células epiteliais pigmentadas da retina organizam-se em monocamada entre a membrana de Bruch e os fotorreceptores da retina. Adaptado de *Sun et al.*.

As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM enriquecido com F12 e GlutaMAX (*Thermo Fisher Scientific*, EUA), que contém aminoácidos, vitaminas, glucose, zinco, ferro e diversos outros componentes que permitem o crescimento de hTERT-RPE-1,

suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS) e com 3,5% (v/v) bicarbonato de sódio.

Foi feita a passagem de células a cada 3-4 dias, garantindo que as células se encontravam confluentes e em divisão. Na passagem de células, primeiramente, o meio de cultura foi removido e as células lavadas duas vezes com 5 mL de DPBS (1X) (*Thermo Fisher Scientific*, EUA) (137,9 NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ e 1,5 mM KH₂PO₄ pH 7-7,3) para lavar o meio e íões (Mg²⁺ e Ca²⁺) que interferem com a atividade enzimática da tripsina-EDTA 0,05% (v/v), que foi posteriormente adicionada (750 µL) e espalhada em toda a placa, garantindo que todas as células estavam cobertas pela enzima, foi retirado o excesso e a placa incubada na estufa durante aproximadamente 3 minutos, para permitir que as células deixassem de aderir à placa. Seguidamente as células foram ressuspensas em meio de cultura e passadas numa diluição de 1:8 para uma nova placa. Por fim, as células foram incubadas na estufa *Snijders* CO190TC-20 (*Snijders*, Países Baixos) a 37 °C, 5 % de CO₂ e cerca de 80 % de humidade relativa até à subcultura seguinte. Todo o procedimento foi feito de forma a manter a esterilidade e usando uma câmara de fluxo laminar vertical *Danlaf* VFRS 1206.

Sempre que necessário fazer um ensaio experimental com número de células específico as células foram contadas num hemocitómetro e foi plaqueado o volume exato de células. As células foram observadas no microscópio de contraste de fase invertido *Olympus* CK40 (*Olympus*, Japão) e fotografadas com câmara compacta *CAMEDIA* C-4040ZOOM (*Olympus*, Japão).

3.2. Microscopia de imunofluorescência

3.2.1. Condições experimentais

Para avaliar o impacto da glucose e dos cílios nas células cultivadas, expusemos as células a diferentes condições. De uma placa principal de 10 mL subcultivámos 3 placas diferentes de 24 poços, em cada placa 4 poços foram subcultivados com 5x10⁴ células com 500 µL de meio de cultura em lamelas de vidro. No primeiro poço não foi adicionada glucose, no segundo poço foi adicionada glucose até uma concentração final de 5 mM, simulando a concentração normal de glucose nas células, no terceiro poço foi adicionada glucose até uma concentração final de 25 mM, cinco vezes o normal e simulando uma quantidade anormal de glucose, uma concentração associada à hiperglicémia observada em doenças metabólicas como obesidade e diabetes (Busik et al., 2008; Maugeri et al., 2017). Por último, foi adicionada glucose até uma concentração final de 5 mM em simultâneo com manitol a uma concentração final de 20 mM, para avaliar se os eventuais resultados foram causados devido ao eventual stress osmótico causado à célula, servindo este como um controlo de stress osmótico, pois as

membranas celulares são pouco permeáveis ao manitol (Figura 3.2. A) (Bowman & Levitt, 1977).

Em seguida, cada placa foi submetida a diferentes condições. Na primeira placa adicionamos a glucose e manitol após 24 horas de incubação. Na segunda, após 24 horas de incubação removemos o DMEM-F12 com FBS 10%, lavamos os poços com DPBS(1X) e adicionamos DMEM-F12 sem FBS 10% para permitir a montagem dos cílios primários. Seguidamente, às 48 horas de incubação adicionamos a glucose e o manitol aos respectivos poços. Na terceira placa fizemos o inverso, ou seja, às 24 horas adicionamos glucose e manitol e às 48 horas removemos o soro do meio de cultura de células. Depois de 72 horas, fixamos todas as células para avançar para um protocolo de imunofluorescência (Figura 3.2. A).

Ao longo do projeto as condições experimentais para imunofluorescência foram alteradas pois achamos que poderíamos melhorar a interpretação de resultados tendo um controle para cada experiência de indução de cílios isolada. Assim, manteve-se a experiência onde após 24 horas de incubação removemos o DMEM-F12 com FBS 10% e substituímo-lo por DMEM-F12 sem FBS 10% para permitir a montagem dos cílios primários. Depois de mais 24 horas adicionamos a glucose e o manitol nas respectivas condições descritas anteriormente. Simultaneamente, realizamos uma experiência onde todas as condições se mantêm exceto no momento da troca do meio às 24 horas, onde em vez de se adicionar DMEM-F12 sem FBS adicionou-se DMEM-F12 com FBS (não induzindo a paragem do ciclo celular e montagem do cílio primário). Aplicou-se o mesmo racional à outra experiência, onde na primeira, às 24 horas adicionamos glucose e manitol e às 48 horas removemos o soro do meio, e na última trocou-se o meio

mantendo o FBS 10%. Este novo modelo foi usado para a visualização de γ H2AX e para a citometria de fluxo (Figura 3.2. B).

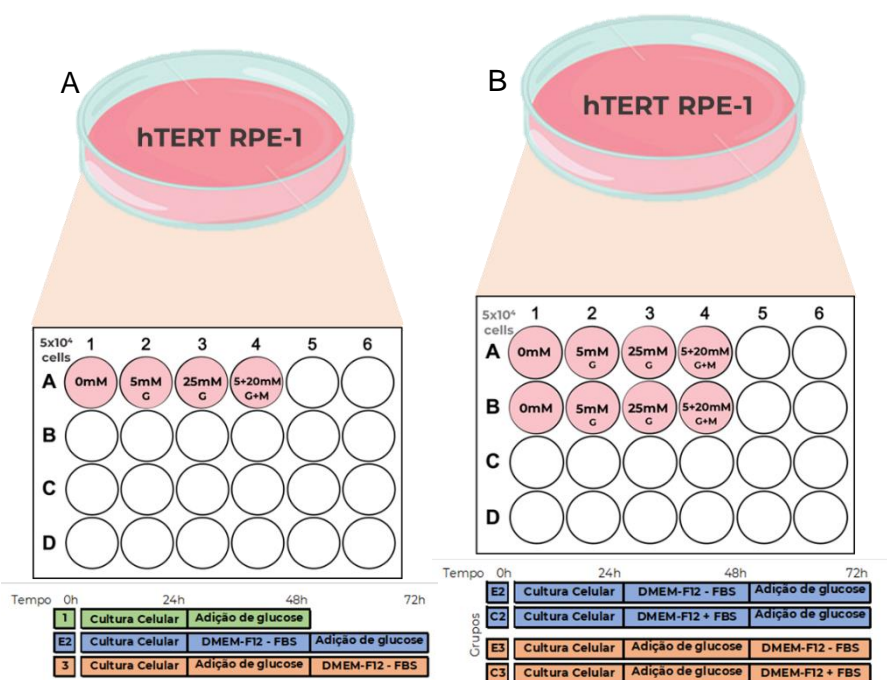


Figura 3.2. Representação esquemática das diferentes condições experimentais estudadas em hTERT-RPE-1.

(A) No grupo de estudo 1 adicionamos glucose em diferentes concentrações (0 mM glucose, 5 mM glucose, 25 mM glucose, 5 mM glucose + 20 mM manitol) após 24 horas em cultura. No grupo 2, após 24 horas em cultura removemos o soro da cultura e às 48 horas adicionamos as diferentes concentrações de glucose. No grupo 3, após 24 horas de cultura adicionamos diferentes concentrações de glucose e às 48 horas removemos o soro do meio. **(B)** O novo ensaio experimental consistiu em fazer um controle individual para cada experiência onde era removido soro para indução de cílios. No grupo de estudo E2, após 24 horas em cultura removemos o soro da cultura e às 48 horas adicionamos as diferentes concentrações de glucose. No grupo C2, após 24 horas em cultura adicionamos novo meio de cultura com soro e às 48 horas adicionamos as diferentes concentrações de glucose. No grupo E3, após 24 horas de cultura adicionamos diferentes concentrações de glucose e às 48 horas removemos o soro do meio. No grupo C3, após 24 horas de cultura adicionamos diferentes concentrações de glucose e às 48 horas adicionamos novo meio de cultura com soro. Foram cultivadas 5×10^4 células por poço.

3.2.2. Microscopia de imunofluorescência

A imunofluorescência permite a detecção de antígenos específicos por anticorpos marcados com fluorocromos diretamente nas células (Coons et al., 1941). Neste projeto, utilizamos a microscopia de imunofluorescência indireta, onde o antígeno específico foi marcado com um anticorpo primário que foi posteriormente detectado por um anticorpo secundário marcado com fluorocromos (Suvarna et al., 2013; Weller & Coons, 1954).

Primeiramente procedeu-se à fixação e permeabilização das células, para isso, antes foi removido o meio e cada poço foi lavado duas vezes com 500 µL de DPBS(1X). No caso da marcação das proteínas YAP e da γ -H2AX as células foram fixadas com 300 µL de paraformaldeído a 4%, à temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, as células foram permeabilizadas com 0,1% *Triton X-100* durante 2 minutos, à temperatura ambiente. Para a marcação da α -tubulina acetilada a fixação e permeabilização foi feita com 300 µL de metanol a -20°C, durante 10 minutos.

Para bloquear ligações não específicas, as amostras foram incubadas com FBS 10% (v/v) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as células foram incubadas com 30 µL de anticorpo primário (ver Tabela 3.1. para diluições utilizadas) diluído em FBS 10%, durante 45 minutos à temperatura ambiente. Após esta incubação foram feitas três lavagens com PBS(1X), 5 minutos com agitação, e de seguida, adicionados 30 µL de anticorpos secundários (ver Tabela 3.1. para diluições utilizadas) diluídos na solução de bloqueio e incubadas 45 minutos à temperatura ambiente, sem exposição à luz. As células foram novamente lavadas três vezes com PBS(1X), 5 minutos com agitação, sem exposição à luz. Posteriormente, o DNA foi marcado com DAPI (1 µg/mL), tendo a incubação ocorrido à temperatura ambiente durante um minuto, sem exposição à luz.

As lamelas foram montadas em lâminas de vidro com 4 µL de meio de montagem *Vectashield* (*Vector Laboratories*, EUA). As lâminas foram observadas no microscópio *Olympus BX41* (*Olympus*, Japão), com uma objetiva de imersão de óleo de 60X. Para a captura de imagem, foi utilizada a câmara *DMK 23U274* (*The Imaging Source*, Alemanha) e o *software IC Capture 2.4* (*The Imaging Source*, Alemanha). As imagens foram processadas com o *software ImageJ 1.53t* (NIH, EUA).

Tabela 3.1. Anticorpos primários e secundários utilizados nos ensaios de microscopia de imunofluorescência, com indicação do animal onde foi produzido, diluição utilizada e fabricante.

	Produzido em	Diluição	Fabricante
Anticorpos primários			
Anti-YAP	Coelho	1/100	ThermoFisher Scientific
Anti-γ-Tubulina	Ratinho	1/200	Sigma-Aldrich
Anti-γ-H2AX	Ratinho	1/200	Sigma-Aldrich
Anti-acetil-α-tubulina	Ratinho	1/100	Sigma-Aldrich
Anti-pericentrina	Coelho	1/400	Abcam
Anticorpos secundários			
Anti-Ratinho Alexa 488	Cabra	1/500	ThermoFisher Scientific
Anti-Coelho Alexa 594	Cabra	1/500	ThermoFisher Scientific

3.3. Análise de extratos proteicos

3.3.1. Condições experimentais

Para avaliar a presença e possível diferença na expressão celular de YAP em cada grupo, subcultivamos 3 placas diferentes de 6 poços, em cada placa 4 poços foram subcultivadas com 3×10^5 células em 2 mL de meio de cultura. As condições de suplementação foram mantidas à semelhança das condições para a análise por microscopia de imunofluorescência. Após 72 horas extraímos as proteínas das células cultivadas (Figura 3.3.).

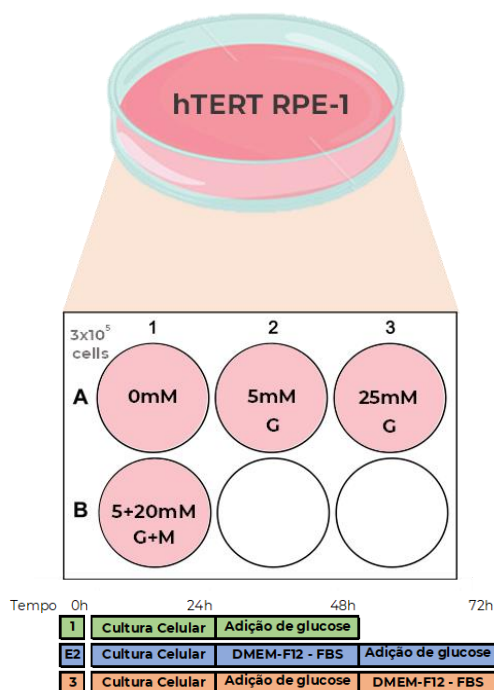


Figura 3.3. Representação esquemática das diferentes condições experimentais estudadas em hTERT-RPE-1.

No grupo de estudo 1 adicionamos glucose em diferentes concentrações (0 mM glucose, 5 mM glucose, 25 mM glucose, 5 mM glucose + 20 mM manitol) após 24 horas em cultura. No grupo 2, após 24 horas em cultura removemos o soro da cultura e às 48 horas adicionamos as diferentes concentrações de glucose. No grupo 3, após 24 horas de cultura adicionamos diferentes concentrações de glucose e às 48 horas removemos o soro do meio. Foram cultivadas 3×10^5 células por poço.

3.3.2. Preparação de extratos proteicos

Para preparar extratos celulares totais, foi removido o meio de cultura e feitas duas lavagens com PBS(1X). Adicionaram-se 100 μ L de tampão de amostra (250 mM Tris-HCl, pH 6.8; 8% SDS (m/v); 0,1% bromofenol (m/v); 40% glicerol (v/v)) com 0,7 μ L de β -mercaptoetanol para desnaturar as proteínas e 0,5 μ L de *Pierce Universal Nuclease for Cell Lysis* para a digestão do DNA/RNA, em cada poço. As células foram raspadas e coletadas para um tubo, e incubadas 30 minutos a 37°C com o referido tampão, e depois aquecidas a 95°C durante 5 minutos.

3.3.3. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

As proteínas foram analisadas por eletroforese em gel poliacrilamida em condições desnaturantes que permitiu a separação das moléculas através de um gel vertical e

descontínuo de poliacrilamida submerso em tampão de eletroforese Tris-Glicina-SDS (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS (m/v), pH 8.3) após aplicar uma intensidade de corrente elétrica constante de 20 mA por gel.

Para o efeito, foi utilizado um gel concentrador a 5% (m/v) de poliacrilamida e um gel resolvente a 10% (m/v). As composições dos géis estão descritas na Tabela 3.2..

Foi utilizado um sistema de mini-géis (*BioRad*, EUA), com géis de dimensão 7 cm x 10 cm x 0,1 cm.

Foram introduzidos 25µL de amostra em cada poço e 4 µL de marcador de massa molecular *NZYColour Protein Marker II*.

Tabela 3.2. Composição do gel resolvente a 10% (m/v) e do gel concentrador a 5% (m/v) de acrilamida, com volume final de 10 mL.

Reagentes	Volume adicionado	
	Gel Resolvente a 10% (m/v)	Gel concentrador a 5% (m/v)
Acrilamida/bisacrilamida (29:1) 40% (m/v)	2,5 mL	1,25 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,9	2,5 mL	0,625 mL
SDS 20% (m/v)	50 µL	50 µL
Água bidestilada	4,85 mL	7,965 mL
Persulfato de amónio 10% (m/v)	32 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL

3.3.4. Eletrotransferência de proteínas

Após a eletroforese, o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose *Protran* origem de poro 0,45 µm (*GE Healthcare*, EUA). Para isso, a membrana de nitrocelulose e o gel foram incubados 30 minutos com agitação com tampão de transferência Tris-Glicina-SDS com metanol (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,0375% SDS (m/v), 20% metanol (v/v); pH 8,3).

Foram colocados sequencialmente na célula de transferência *semi-dry Trans-Blot SD* (*BioRad*, EUA) 3 papéis de filtro 3MM, a membrana de nitrocelulose, o gel de poliacrilamida e novamente 3 papéis de filtro 3MM, todos com a dimensão aproximada de 7x10 cm. A eletrotransferência de proteínas foi feita a 15V, 385 mA, durante 45 minutos, com uma fonte de tensão *Electrophoresis Power Supply EPS 601* (*Amersham Biosciences*, Reino Unido).

Posteriormente, a membrana foi corada com *Ponceau S* (*Ponceau S* 2% (m/v), ácido tricloroacético 30% (m/v) e ácido sulfosalicílico 30% (m/v)) para avaliar os resultados da eletroforese, com o marcador de massa molecular como referência visual para avaliar a transferência de proteínas.

3.3.5. Western Blot

Após a transferência de proteínas, a membrana foi bloqueada com 5% (v/v) de leite magro em pó em PBS (1X), durante 45 minutos, que bloqueia locais ativos na membrana para evitar a ligação não específica do anticorpo à própria membrana. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-YAP (produzido em coelho), diluído 1/1000 em solução de bloqueio durante 45 minutos, com agitação e à temperatura ambiente. No final da incubação, a membrana foi lavada três vezes com PBS Tween 0,1%, durante 10 minutos com agitação. E depois os complexos antigénio-anticorpos foram identificados com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rábano (HRP), específico para a deteção de imunoglobulinas produzidas em coelho, numa diluição de 1/1000 em solução de bloqueio, que foi incubado por 45 minutos, com agitação e à temperatura ambiente. Finalmente, a membrana foi lavada novamente três vezes, mas desta vez com PBS (1X), durante 10 minutos com agitação. Para deteção da proteína foi usado o kit *ECL Prime Western Blotting Detection Reagents*, de acordo com o protocolo do fabricante. Foi feita a revelação no instrumento *ImageQuant Las 500* (GE Healthcare, EUA).

3.4. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo permite medir as características óticas, como tamanho, granularidade e fluorescência de uma única célula num fluido quando esta passa através de uma fonte de luz. A quantificação destes parâmetros é feita através da incidência de um laser na amostra, e da consequente dispersão de luz e emissão de fluorescência, que estão diretamente relacionadas com as propriedades da célula. A citometria de fluxo pode ser usada para diferentes fins, nomeadamente avaliação do ciclo celular e proliferação celular (Adan et al., 2017).

À semelhança das condições usadas na microscopia de imunofluorescência foram plaqueadas 4 placas de 24 poços, mas neste caso sem lamela, sujeitas às mesmas condições de suplementação e indução da montagem de cílios, cada poço com 500 μ L de meio DMEM-F12 e 5×10^4 células (Figura 3.2. B).

Primeiramente, o meio de cultura foi removido e as células lavadas duas vezes com 250 μ L de DPBS (1X). Posteriormente foram adicionados 37,5 μ L de tripsina-EDTA 0,05% (v/v), foi retirado o excesso e a placa incubada na estufa durante aproximadamente 3 minutos. As células foram ressuspensas em meio DMEM-F12 e a amostra centrifugada a 500g durante 10 minutos, de forma a recolher as células. As células foram novamente lavadas duas vezes com 500 μ L de PBS (1X), ressuspensas e as amostras centrifugadas nas mesmas condições. Removeu-se o sobrenadante e o *pellet obtido* foi

fixado em etanol 70° em PBS (1X) durante a noite. Após a fixação as células foram recolhidas por centrifugação e novamente ressuspensas em PBS (1X) e centrifugadas. Posteriormente, o *pellet* celular obtido foi incubado 30 minutos à temperatura ambiente com 0,1% *Triton X-100* em PBS 1X com RNAase (5 µg/mL), para permeabilizar as células, e logo de seguida incubado com iodeto de propídeo (5 µg/mL, *ThermoFisher Scientific*, EUA), que se intercala na molécula de DNA. O *pellet* foi incubado 5 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz.

A leitura das amostras foi feita imediatamente no citómetro *CytoFLEX A00-1-1102* (*Beckman Coulter Life Sciences*, EUA) com o software *CytExpert* (*Beckman Coulter Life Sciences*, EUA).

3.5. Previsão da estrutura tridimensional da proteína variante ALMS1

Para avaliar como a variante c.5552C>T ALMS1 identificada por Ginete et al., 2021, recorreremos ao servidor *AlphaFold2 (ColabFold v1.5.1: AlphaFold2 w/ MMseqs2)* (Mirdita et al., 2022) para prever alterações na estrutura tridimensional da proteína variante c.5552C>T codificada pelo gene ALMS1. Esta análise teve por objetivo prever alterações nas estruturas tridimensionais da proteína ALMS1 mutada que pudessem dar informações sobre como o seu funcionamento poderia ser afetado. Nesta análise foram utilizados os primeiros 2500 resíduos de aminoácidos da proteína canónica e da variante gerada pela mutação

3.6. Sistema CRISPR/Cas9 – Recombinação homóloga

3.6.1. Transfecção de hTERT-RPE-1 para mutação direcionada no gene ALMS1

O sistema *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) com a CRISPR-associated protein 9 (Cas9) foi usado para a edição do genoma especificamente no gene *ALMS1* no sentido de obter uma linha celular de células hTERT-RPE-1 que expressasse constitutivamente a proteína mutante. O sistema CRISPR/Cas9 permite a clivagem da cadeia dupla de DNA e a edição direcionada de genes em células eucarióticas. A clivagem genética é guiada por sequências de RNA guia (sgRNA), constituído por uma sequência crRNA em conjunto com um tracrRNA. O crRNA é um fragmento pequeno de RNA com 20 nucleótidos complementar à região do DNA que queremos clivar, e forma um complexo com o tracrRNA, que tem uma sequência específica reconhecida pela Cas9 e que permite a ligação à mesma. A clivagem da cadeia de DNA complementar ao crRNA é feita pelo domínio HNH da Cas9 e a cadeia oposta é clivada pelo domínio RuvC da Cas9. Para o sistema funcionar, é necessário, para além do reconhecimento de complementaridade de bases entre o DNA

alvo e o crRNA, a presença de um *Protospacer Adjacent Motif* (PAM) que como o nome indica se localiza adjacente à sequência alvo do DNA, e interage com o domínio C-terminal da Cas9 na cadeia não complementar de DNA e com o primeiro grupo fosfodiéster da sequência de DNA alvo, levando à separação das cadeias de DNA. Em seguida, a maquinaria celular faz uma reparação homóloga desta quebra, neste caso através da inserção do DNA de cadeia única que foi fornecido e que apresenta a sequência nucleotídica exata para reparação igual ao gene *ALMS1* com exceção do nucleótido que queremos alterar (Figura 3.4.) (Tabela 3.3.) (Doudna & Charpentier, 2014; Hsu et al., 2014).

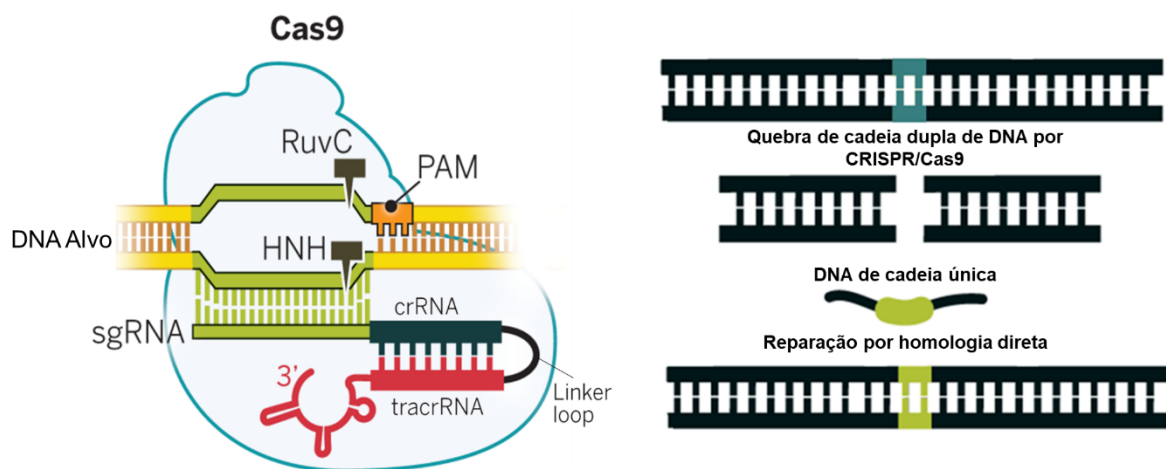


Figura 3.4. Sistema CRISPR/Cas9 e reparação por homologia direta.

O sistema CRISPR/Cas9 permite a clivagem da dupla cadeia de DNA e a edição direcionada de genes em células eucarióticas. A clivagem genética é guiada por sequências de RNA guia (sgRNA), constituído por uma sequência crRNA em conjunto com uma sequência tracrRNA. A clivagem da dupla cadeia de DNA é feita pelos domínios HNH (cadeia complementar a crRNA) e RuvC (fita oposta) da Cas9. O motivo PAM é fundamental na separação das cadeias de DNA. A estratégia usada foi reparação por homologia direta, fornecendo uma cadeia de DNA única com um nucleótido alterado, para induzir a reparação da dupla cadeia de DNA com a mutação que queríamos estudar. Adaptado de Doudna & Charpentier, 2014.

Neste caso, direcionámos a clivagem para o nucleótido 5552 no exão 8 do gene *ALMS1*, com a intenção de obter uma mutação direcionada onde um nucleótido de citosina normalmente localizada nesta posição seria substituído por um nucleótido de timina. Esta substituição resultaria na síntese de um aminoácido diferente na posição 1851, alterando de prolina para leucina.

Para isso, as células foram cultivadas em placas de 12 poços, foi subcultivado um poço com 1×10^5 células com 1mL de DMEM-F12 sem antibióticos e incubados durante 24 horas.

O crRNA (12pmol) e o tracrRNA (12pmol) (*Sigma-Aldrich*, Alemanha) foram incubados em gelo durante 10 minutos, depois foi adicionada a Cas9 (*Sigma-Aldrich*, Alemanha) durante 30 minutos em gelo. O DNA de cadeia única (50 pmol) (Dharmacon, EUA) (Tabela 3.3.), 100 µL do meio OptiMEM (*Thermo Fisher Scientific*, EUA) e 5 µL do agente de transfeção trans-IT (*Sigma-Aldrich*, Alemanha) foram adicionados e incubados por mais 30 minutos à temperatura ambiente. Estes foram adicionadas às células após a incubação de 24 horas, que foram então incubadas por mais 72 horas.

Tabela 3.3. Sequência de DNA de cadeia única e do RNA guia utilizados no sistema CRISPR/Cas9. A vermelho indicado o nucleótido alterado.

Reagente	Sequência
DNA de cadeia única	GAA TAA ACA TCC TGC CCT CTA ATT CCT ACC TAC AGA GAG AGC ACT CTG TCA TTT CTT ATG A
RNA guia	GTG GGT AGG AAT TAG AGG GCA GG

3.6.2. Isolamento de clones

Para isolar os clones obtidos, após 72 horas de incubação as células foram ressuspensas em 1 mL de DMEM-F12 e semeámos 100 células numa placa de Petri de 10mL, as placas foram incubadas e depois observadas diariamente para verificar se havia novas colónias celulares. Sempre que foi identificada uma nova colónia, lavámos a placa cuidadosamente com DPBS(1X) e colocámos discos com tripsina sobre as colónias, que foram incubados durante aproximadamente 3 minutos.

Os discos foram então incubados numa placa de 12 poços com DMEM-F12 e antibióticos. À medida que a densidade celular aumentava, as células foram sendo subcultivadas em placas com volumes progressivamente maiores.

Para garantir que as células estavam verdadeiramente isoladas, semeamos cada clone identificado anteriormente numa placa de 96 poços. Foi incubada aproximadamente uma célula por poço com 150 µL do meio DMEM-F12. Como antes, à medida que as células se tornavam confluentes, subcultivámo-las em placas com volumes progressivamente maiores.

3.7. Extração de DNA dos clones obtidos e PCR

Quando as placas dos clones ficaram confluentes procedemos à extração celular do DNA. Para isso, as células foram raspadas mecanicamente da placa de Petri em 1mL de PBS 1X e recolhidas por centrifugação a 500g durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Sendo que a extração de DNA é um processo sensível ao pH, o *pellet* de células obtido foi ressuspendido em 150 µL de Tris-HCl, 5 mM, pH 8.8 para impedir

variações acentuadas do pH durante a lise celular e extração, e depois aquecido a 95°C durante 10 minutos. Após arrefecer, foram adicionados 30 µg de Proteinase K para inativar nucleases e a amostra foi incubada durante 30 minutos a 56°C. A enzima foi depois inativada durante 10 minutos a 95°C. As amostras foram centrifugadas a 16000 g durante 1 minuto e o sobrenadante que continha o DNA foi recolhido. O DNA obtido foi quantificado utilizando o espectrofotômetro *mySPEC*.

Em seguida, o DNA extraído foi amplificado por *polymerase chain reaction* (PCR). Na reação de PCR os *primers* usados para amplificar foram sintetizados pela STAB VIDA, Portugal e foi usado o *LongAmp® Taq 2X Master Mix* (*New England Biolabs Inc.*, EUA). Foram usados dois conjuntos de *primers*, o primeiro que produziu um fragmento de amplificação de maior tamanho, e um segundo conjunto de *primers* que produziu um fragmento de amplificação de menor tamanho e permitiu uma interpretação mais fácil da sequenciação.

A composição da mistura para PCR utilizada encontra-se descrita na Tabela 3.4.. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se descritas na Tabela 3.5.. A reação de PCR foi efetuada num termociclador *Mastercycler* (*Eppendorf*, Alemanha), nas condições descritas na Tabela 3.6..

Tabela 3.4. Composição da mistura utilizada para a amplificação do DNA extraído dos clones produzidos através do sistema CRISPR/Cas9.

Reagentes usados	Volume
LongAmp® Taq 2X Master Mix	12,5 µL
Primer forward (10 µM)	1 µL
Primer reverse (10 µM)	2 µL
DNA dos clones	~500ng
Água MiliQ	perfezer até 25µL

Tabela 3.5. Sequências dos primers utilizados na amplificação e sequenciação do DNA extraído dos clones produzidos através do sistema CRISPR/Cas9.

Primers	Sequência
ALMS1 F	5'- GCC CAT TAC TTT CTA CCG GC-3'
ALMS1 R	5'- AAG GGT AGC TGC TGG AAA CT-3'
ALMS1 F v2	5'- CCC ATT GTT TCC TAC CAG CG-3'
ALMS1 R v2	5'- CTC AGT CTT CCG GTC ACC TT-3'

Tabela 3.6. Condições utilizadas na amplificação por PCR do DNA extraído dos clones produzidos por CRISPR/Cas9.

Fase	Temperatura		Tempo		Número de ciclos
	<i>Primers v1</i>	<i>Primers v2</i>	<i>Primers v1</i>	<i>Primers v2</i>	
Desnaturação inicial	94°C	94°C	30 s	30 s	1
Desnaturação	94°C	94°C	30 s	30 s	30
Annealing	59°C	55°C	1 min	1 min	
Extensão	65°C	65°C	1min 20s	30s	
Extensão final	65°C	65°C	10 min	10 min	1

3.8. Eletroforese de DNA em gel de agarose

A eletroforese do gel agarose permitiu a análise de fragmentos de DNA através da sua migração ao longo de um gel horizontal submerso em tampão TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0) a 80 V e durante aproximadamente 1 hora.

Para a análise de fragmentos de DNA, utilizámos um gel de agarose de 3% (m/v) em tampão TAE 1X com 1 µL de GreenSafe Premium (NZYTech, Portugal) por 50 mL de gel.

A cada amostra adicionámos 6 µL de tampão de amostra (glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,25% (m/v)) e introduzimos 25µL de cada amostra em cada poço e 4 µL de marcador de massa molecular *NZYDNA Ladder III*.

As bandas correspondentes aos fragmentos de DNA obtidas foram observadas num transiluminador *Syngene GX-2020SL-E60 UV*. O fragmento de DNA foi então excisado e purificado utilizando o Kit de Extração de Gel *QIAquick*. Posteriormente, foi feita uma análise num gel de agarose a 1% (m/v) com o marcador de massa molecular *NZYDNA Ladder III* para confirmar a presença do DNA antes do seu envio para sequenciação.

3.9. Análise de dados

Para quantificar a γ -H2AX e YAP em imagens de imunofluorescência foi utilizado o software *CellProfiler* (Broad Institute, USA). Para quantificação de *Western Blot* foi utilizado o software *ImageJ 1.53t* (NIH, EUA). Para interpretação de resultados de citometria de fluxo utilizou-se o software *CytExpert (Beckman Coulter Life Sciences, EUA)* e *FlowJo 10.8.1. (BD Life Sciences, EUA)*.

Para validar os resultados experimentais obtidos procedeu-se à sua análise estatística com recurso ao *Microsoft Excel (Microsoft, EUA)*. Em todos os casos utilizou-se o teste *t* de *Student* com exceção da avaliação do ciclo celular onde o teste estatístico utilizado

foi o qui-quadrado. Em qualquer um dos casos, considerou-se que uma amostra seria significativamente diferente do controlo quando o valor de p obtido foi inferior a 0,05.

4. Resultados

4.1. Impacto de diferentes condições de glucose na expressão de YAP em hTERT-RPE-1

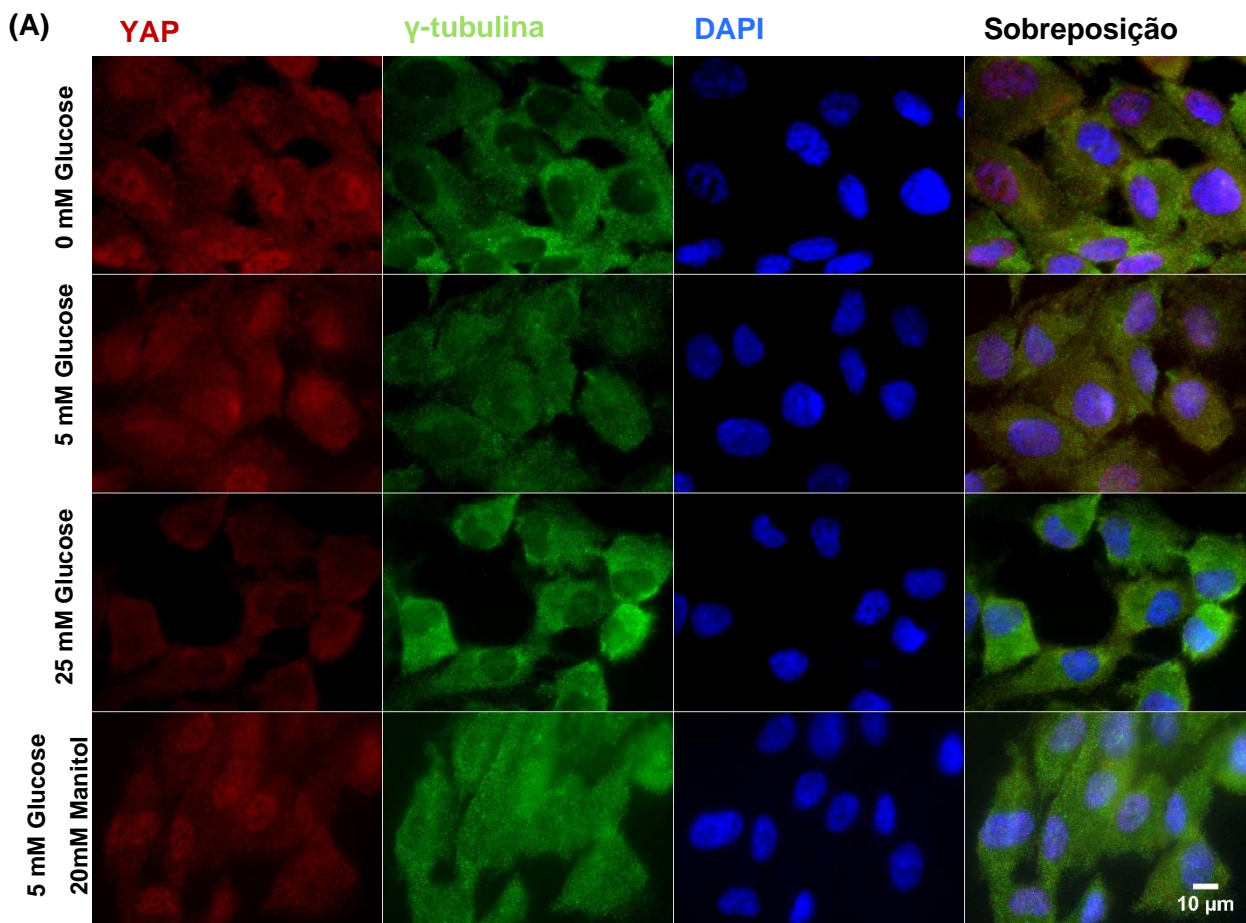
Como referido anteriormente as ciliopatias estão associadas a diversas alterações metabólicas que podem resultar no desenvolvimento de obesidade e diabetes. Pensa-se que a causa destas alterações metabólicas possa estar relacionada com alteração no funcionamento normal de vias de sinalização associadas ao cílio primário, nomeadamente a via Hippo (Hildebrandt et al., 2011; Wheway et al., 2018). Quando a via Hippo é inativada, sabe-se que a proteína reguladora YAP migra para o núcleo. Esta translocação responde a uma variedade de fatores biomecânicos e bioquímicos que condicionam a sua ativação. Em células tumorais e embrionárias a presença de elevadas concentrações de glucose no meio leva à translocação de YAP para o núcleo e ativa os fatores de transcrição que induzem divisão e proliferação celular, pelo contrário, em caso de privação de glucose ou inibição da glicólise o YAP parece ficar retido no citoplasma (DeRan et al., 2014; Enzo et al., 2015; Mo et al., 2015; Wang et al., 2015).

Para estabelecer uma potencial relação entre a regulação metabólica da glucose e a via Hippo através do cílio, estudámos a expressão de YAP em células epiteliais pigmentadas da retina humana sujeitas a diferentes concentrações de glucose (0 mM, 5 mM, 25 mM e 5 mM+20 mM manitol) e em diferentes condições de formação de cílios (Suplementação, Cílios + Suplementação, Suplementação + Cílios), como descrito no ponto 3.2.1 no capítulo Materiais e Métodos. O complexo YAP/TAZ inclui dois efetores a jusante da Hippo, que apesar terem funções únicas individualmente, têm muitos aspetos da sua regulação e função partilhados (Varelas, 2014), por isso visualizámos apenas os níveis de YAP celular. Avaliámos os níveis de expressão de YAP na célula por imunofluorescência, usando para isso anticorpos anti-YAP e anti- γ -tubulina, um marcador centrossomal. Através da marcação dos núcleos com DAPI pudemos delimitar o compartimento nuclear e inferir a fração nuclear, enquanto a marcação da γ -tubulina conjuntamente com o DAPI permitiu estimar a fração citoplasmática de YAP.

Na experiência onde não foram induzidos cílios, adicionámos somente as diferentes concentrações de glucose e mantivemos as células em cultura 24 horas, para perceber se esta variação da glucose tinha impacto na expressão de YAP nas hTERT-RPE-1. Ao adicionar concentrações equiparadas às fisiológicas na célula (5 mM) verifica-se um aumento dos níveis totais de YAP celular, bem como dos seus níveis no compartimento nuclear e citoplasmático (Figura 4.1. A, B). Quando adicionados 20 mM de manitol com 5 mM de glucose observa-se a mesma tendência, indicando que níveis de YAP na célula

aumentam em função da adição de glucose e não de manitol (Figura 4.1. A, B). O manitol poderá estar a contrariar ligeiramente o efeito da glucose, tornando o seu efeito menos evidente, uma vez que, apesar da tendência ser a mesma, os níveis de aumento da fluorescência são menores. Em contrapartida, quando adicionámos concentrações de glucose representativas de condições patológicas (25 mM) verifica-se um decréscimo dos níveis do YAP celular e também dos seus níveis no compartimento nuclear e no citoplasma (Figura 4.1. A, B). Ao adicionar 25 mM, verifica-se ainda uma diminuição ligeira na percentagem de marcação nuclear em comparação às células não sujeitas a suplementação de glucose, e nas sujeitas à adição de 5 mM de glucose, ainda que não seja significativa (0 mM – 35%; 5 mM – 36%; 25 mM – 33%; 5+20 mM – 36%) (Figura 4.1. C) (Figura 4.4.).

Células não ciliadas e suplementadas com glucose



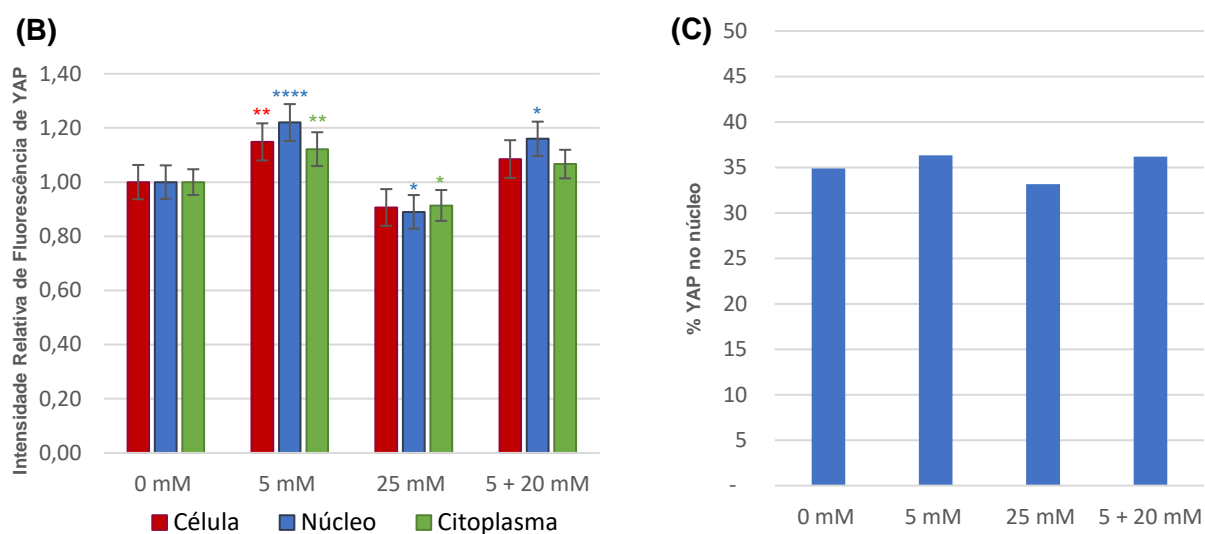


Figura 4.1. Intensidade de YAP em células suplementadas.

(A) Imagens representativas da marcação de YAP em células hTERT RPE-1 quando suplementadas com 0 mM, 5 mM e 25 mM de glucose e 5 mM de glucose com 20 mM de manitol. Para análise destas células utilizaram-se os anticorpos anti-YAP e anti- γ -tubulina. O DNA foi marcado com DAPI. **(B)** Representação gráfica da intensidade de fluorescência relativa de YAP na célula, no compartimento nuclear e no citoplasma nas mesmas condições que em (A). **(C)** Representação gráfica da percentagem dos níveis nucleares de YAP nas diferentes condições. Os dados estão representados como média \pm intervalo de confiança a 95% de 3 experiências independentes. A variação foi considerada significativa quando o valor de p foi <0,05 (*), <0,01 (**), <0,001 (***) e <0,0001 (****).

De acordo com o descrito na literatura, ao adicionar glucose ao meio observou-se uma maior expressão de YAP na célula, no entanto, quando a concentração de glucose aumenta significativamente observamos um efeito inverso. Podemos considerar que possa existir um intervalo em que o aumento de glucose esteja diretamente relacionado ao aumento da expressão de YAP, mas que acima de uma dada concentração de glucose possa haver um efeito inverso, podendo haver alguma forma de retrocontrolo negativo, que impede a hiperativação de YAP no núcleo, levando eventualmente à sua degradação e/ou menor síntese.

Para perceber se a presença de cílio primário tinha algum impacto na resposta celular do YAP às diferentes concentrações de glucose testadas, complementámos a experiência induzindo a formação de cílios através da remoção de soro, antes e depois da suplementação com a glucose. Para confirmar a formação de cílios adicionámos uma lamela controlo em cada experiência, onde após 24 horas em cultura removemos o soro e lavámos as células com DPBS (1X), adicionando depois novo meio de cultura sem soro, no fim marcámos as células com anticorpos anti-acetil- α -tubulina, marcador dos microtúbulos do axonema ciliar, e anti-pericentrina, como marcador do

centrossoma/corpo-basal. A percentagem de células ciliadas variou entre a 8,9% e 17,5% (Figura 4.5. A).

Ao induzir a formação de cílios antes da suplementação com glucose a tendência da variação dos níveis celulares de YAP é semelhante à das células não ciliadas (Figura 4.2 A, B) (Figura 4.5. B), no entanto, observámos que o aumento de YAP celular e dos seus níveis no compartimento nuclear e citoplasmático diminuía relativamente aos níveis encontrados nas células onde não houve formação de cílio (Figura 4.5. B). Isto foi observado tanto quando eram adicionados 5 mM como 25 mM de glucose. Esta observação poderá ser devida à ativação do complexo MST1/2-SAV1 aquando da formação do cílio primário, que leva à retenção citoplasmática de YAP e à sua degradação, impedindo a ativação de genes como consequência do aumento de glucose no meio. Deste modo a presença de cílio parece impedir o aumento da expressão celular de YAP quando adicionados 5 mM de glucose e acentuar a diminuição dos seus níveis quando adicionados 25 mM de glucose. Por outro lado, no controlo com manitol, que é um controlo de stress osmótico, pois as membranas celulares são pouco permeáveis ao manitol, a fluorescência devida à marcação com o anticorpo específico para o YAP parece aumentar na presença do cílio primário, indicando que de alguma forma a presença do manitol, potencia, através do cílio, uma maior expressão de YAP, e que, ao contrário da glucose, na presença de manitol a célula quando monta o cílio primário não tem a capacidade de atenuar a expressão de YAP (Figura 4.2. A, B) (Figura 4.5. B).

Em comparação à experiência onde não foram induzidos cílios, a tendência da percentagem de YAP no núcleo parece inverter-se, sendo que as células sujeitas a 25 mM de glucose após a formação de cílios são as que apresentam maior percentagem de marcação nuclear em comparação às outras condições analisadas, ainda que as variações não sejam significativas, parecendo haver uma aproximação dos valores de YAP nuclear em células suplementadas e em células não suplementadas (0 mM – 33%; 5 mM – 33%; 25 mM – 34%; 5+20 mM – 32%) (Figura 4.2. C) (Figura 4.4.). Para as restantes condições analisadas, que não os 25 mM, parece haver um decréscimo dos níveis nucleares do YAP, comparativamente às células não ciliadas (Figura 4.4.).

Células ciliadas antes da suplementação com glucose

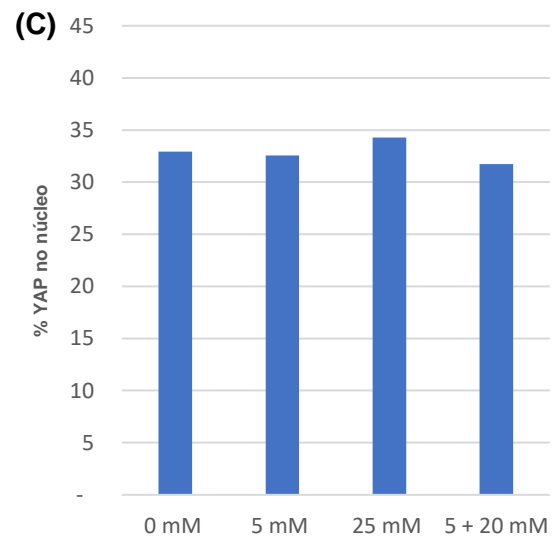
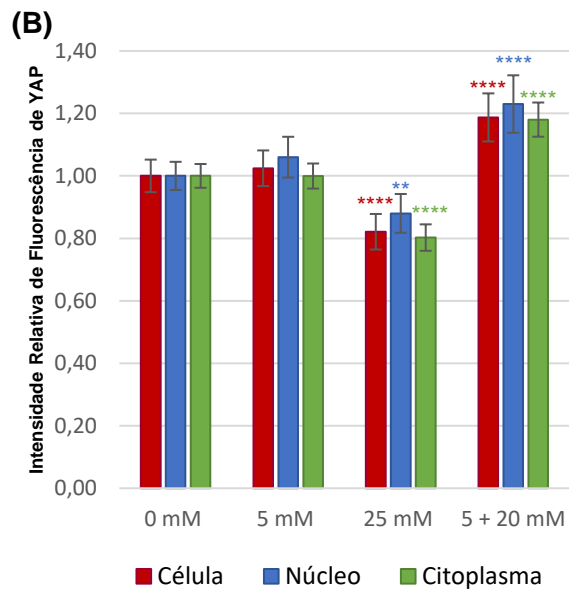
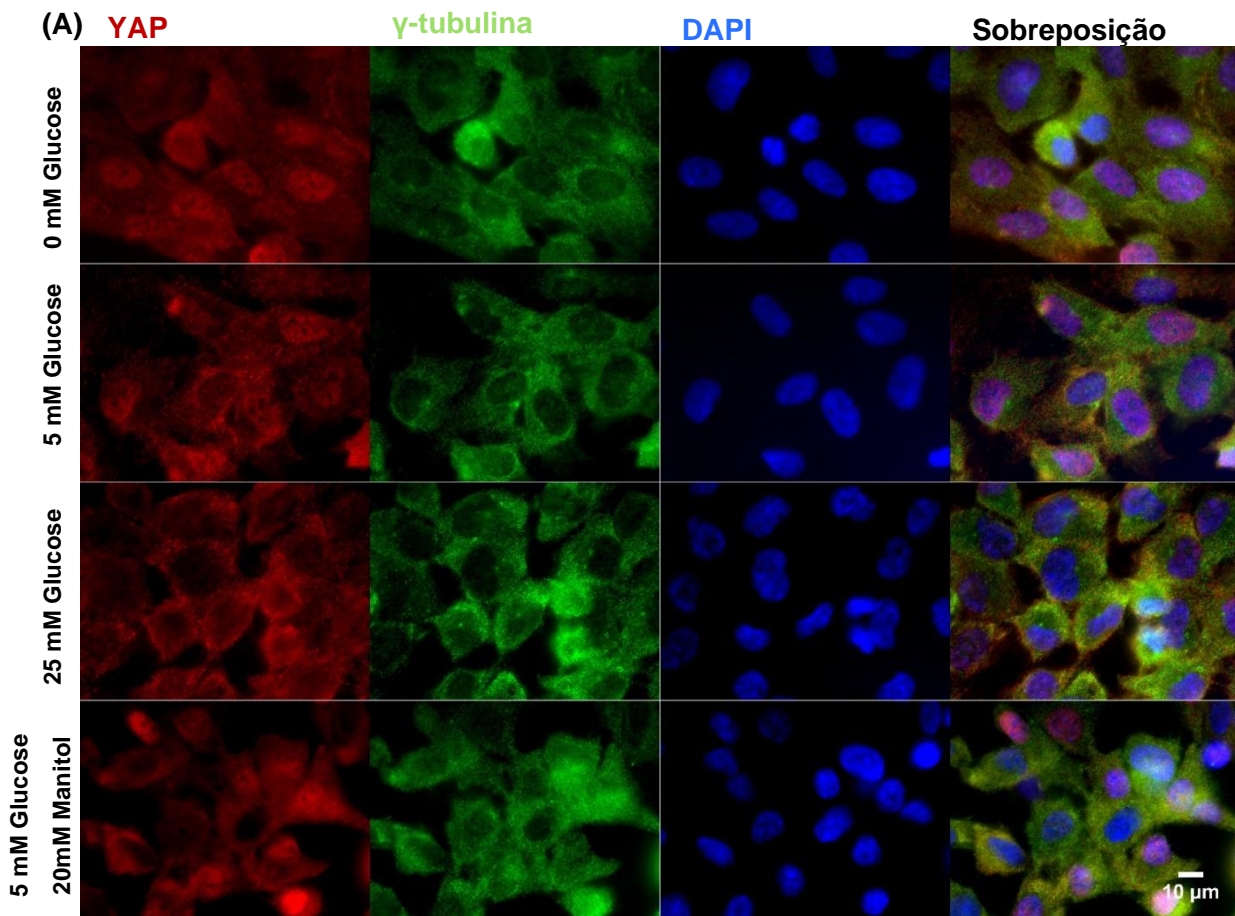


Figura 4.2. Intensidade de YAP em células ciliadas antes da suplementação com glucose.

(A) Imagens representativas da marcação de YAP em células hTERT RPE-1 quando ciliadas às 24 horas e suplementadas com 0 mM, 5 mM e 25 mM de glucose e 5 mM de glucose com 20 mM de manitol às 48 horas de cultura. Para análise destas células utilizaram-se os anticorpos anti-YAP e anti- γ -tubulina. O DNA foi marcado com DAPI. **(B)** Representação gráfica da intensidade de fluorescência relativa de YAP na célula, no compartimento nuclear e no citoplasma nas mesmas condições que em (A). **(C)** Representação gráfica da percentagem dos níveis nucleares de YAP nas diferentes condições. Os dados estão representados como média \pm intervalo de confiança a 95% de 3 experiências independentes. A variação foi considerada significativa quando o valor de p foi $<0,05$ (*), $<0,01$ (**), $<0,001$ (***) e $<0,0001$ (****).

Nas células em que induzimos a montagem de cílios, após 24 horas de suplementação com glucose e manitol, observa-se um aumento geral dos níveis de imunofluorescência de YAP celular em comparação às células que não foram expostas à glucose (Figura 4.3.A, B), às células que apenas estiveram expostas à glucose sem formação de cílio e em relação às células onde foi induzida a formação de cílios antes da suplementação com glucose (Figura 4.5. B).

À semelhança da experiência onde as células foram apenas suplementadas com glucose, ao adicionar 5 mM de glucose observamos um aumento, mas aqui significativamente maior dos níveis de YAP na célula e nos seus compartimentos nucleares e citoplasmáticos (Figura 4.3. A, B) (Figura 4.5. B). As diferenças entre os níveis de YAP em condições de 25 mM de glucose é significativa, pois inverte a tendência observada tanto na experiência onde só houve suplementação como na experiência onde as células foram ciliadas antes da suplementação, havendo um aumento significativo da expressão de YAP em todos os compartimentos celulares estudados (Figura 4.3. A, B) (Figura 4.5. B). Na presença de 20 mM de manitol observa-se um aumento extraordinário na expressão de YAP, em provável relação com o efeito osmótico causado pelo manitol (Figura 4.3. A, B) (Figura 4.5. B). O resultado observado pode dever-se ao tempo que passou desde que as células foram expostas à glucose, sendo que comparativamente à experiência onde só foi adicionada glucose e manitol e à experiência onde as células foram ciliadas antes da suplementação, estas células foram suplementadas após 24 horas em cultura, mantendo-se mais 48 horas em cultura após a suplementação para permitir a indução de cílios. Este resultado indica ainda que a presença de cílios após a adição de glucose não é suficiente para impedir o aumento da expressão de YAP na célula, ao contrário do que se verificou quando estão presentes cílios antes da suplementação com glucose. Em termos de percentagem dos níveis de YAP no compartimento nuclear, verificamos uma tendência semelhante à das células ciliadas antes da suplementação, onde em todas as condições estudadas observa-se uma diminuição de YAP, com exceção dos 25 mM em que aumenta em comparação às

células nas outras condições de suplementação (0 mM – 32%; 5 mM – 32%; 25 mM – 35%; 5+20 mM – 33%) (Figura 4.3. C) e em relação à experiência onde só foi feita suplementação, sem indução de cílios (Figura 4.4.).

Células ciliadas após suplementação com glucose

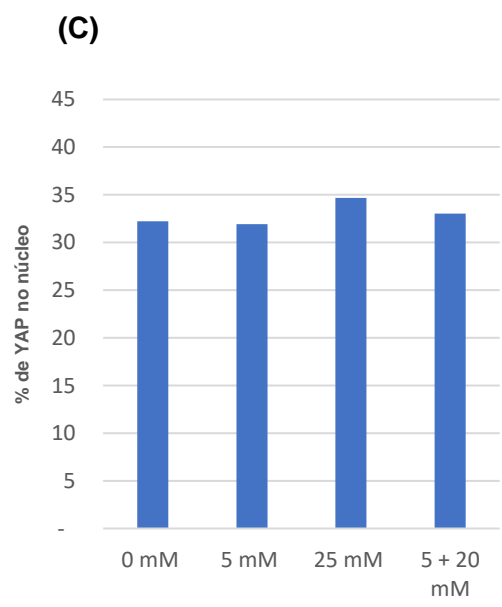
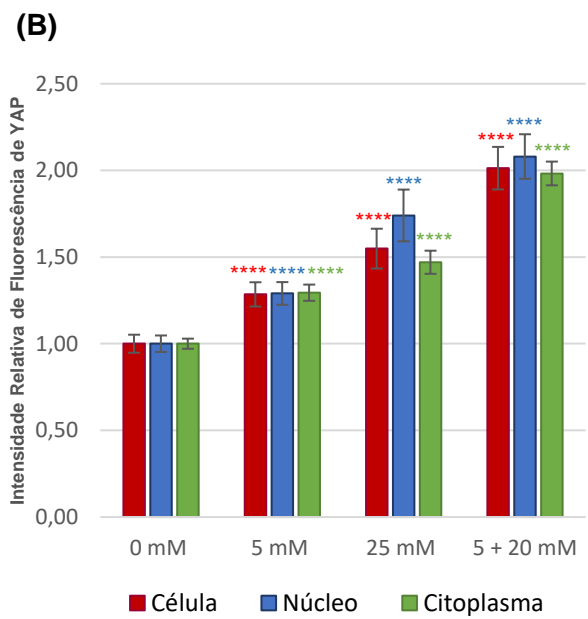
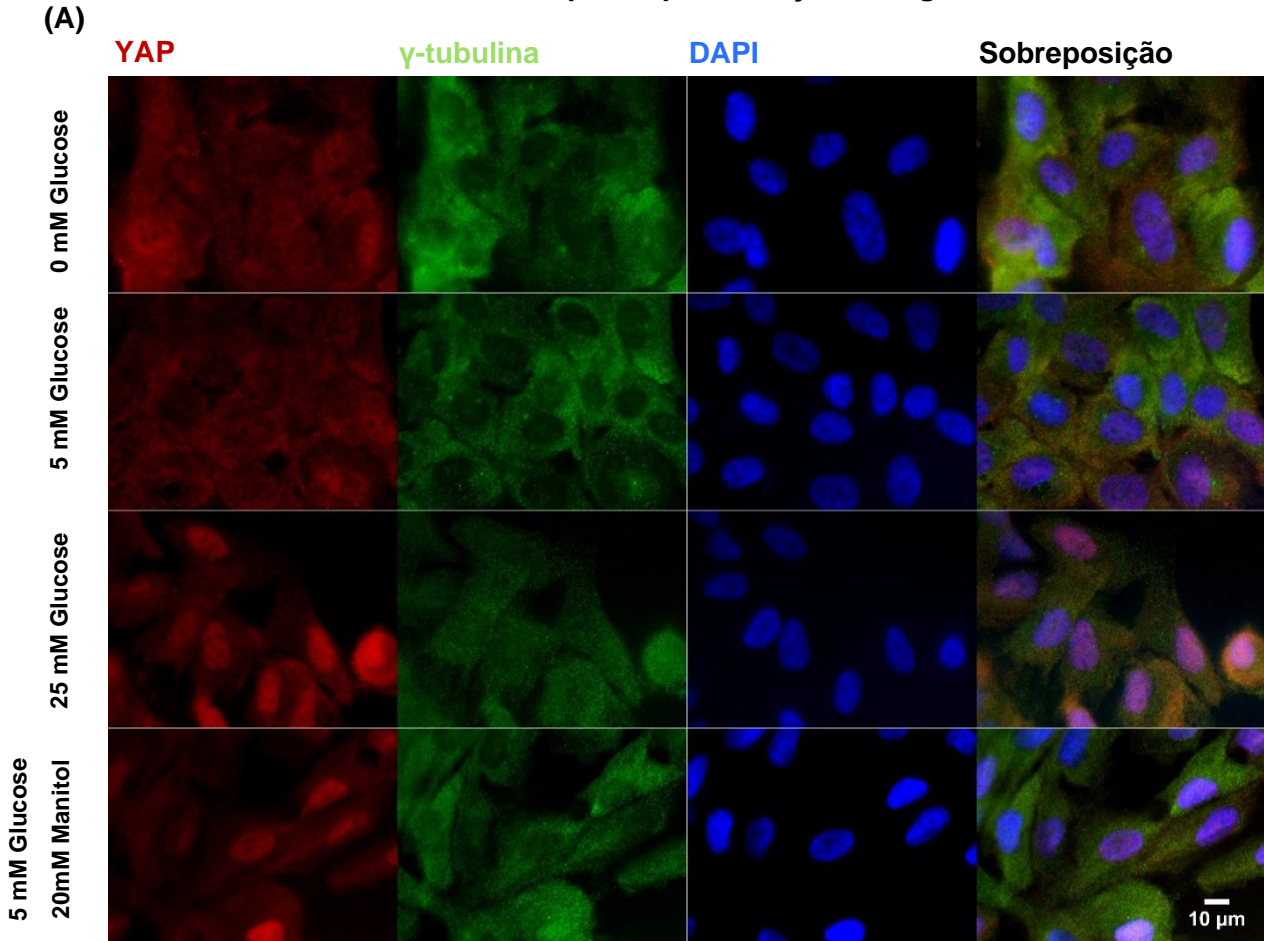


Figura 4.3. Intensidade de YAP em células ciliadas após suplementação com glucose

(A) Imagens representativas da marcação de YAP em células hTERT-RPE-1 suplementadas com 0 mM, 5 mM e 25 mM de glucose e 5 mM de glucose com 20 mM de manitol às 24 horas e ciliadas às 48 horas de cultura. Para análise destas células utilizaram-se os anticorpos anti-YAP e anti- γ -tubulina. O DNA foi marcado com DAPI. (B) Representação gráfica da intensidade de fluorescência relativa de YAP na célula, no compartimento nuclear e no citoplasma nas mesmas condições que em (A). (C) Representação gráfica da percentagem dos níveis nucleares de YAP nas diferentes condições. Os dados estão representados como média \pm intervalo de confiança a 95% de 3 experiências independentes. A variação foi considerada significativa quando o valor de p foi <0,05 (*), <0,01 (**), <0,001 (***) e <0,0001 (****).

Apesar de observarmos tendências diferentes entre as experiências verifica-se que em termos percentuais, os níveis nucleares YAP mantêm-se sempre entre os 32% e os 36%, não havendo variações significativas entre os grupos. Porém, observa-se uma tendência em ambas as experiências com cílios para uma diminuição geral dos níveis nucleares desta proteína com exceção de um ligeiro aumento no compartimento nuclear aquando da adição de 25 mM de glucose comparativamente ao controlo (Figura 4.4.). A manutenção dos níveis do YAP no compartimento nuclear, mesmo quando observamos variações na expressão de YAP na célula, sugere a existência de uma regulação apertada dos níveis deste regulador no compartimento nuclear onde se espera que ele atue. De facto, a hiperativação de YAP no núcleo está associada a condições patológicas como tumorigénese e ao desenvolvimento embrionário (Enzo et al., 2015; Santinon et al., 2016; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2017). A observação de que os níveis de YAP nos diferentes compartimentos variam de forma semelhante sugere que deverá estar a ocorrer um controlo a nível da síntese da proteína ou da sua degradação, e não necessariamente translocação do YAP entre compartimentos celulares.

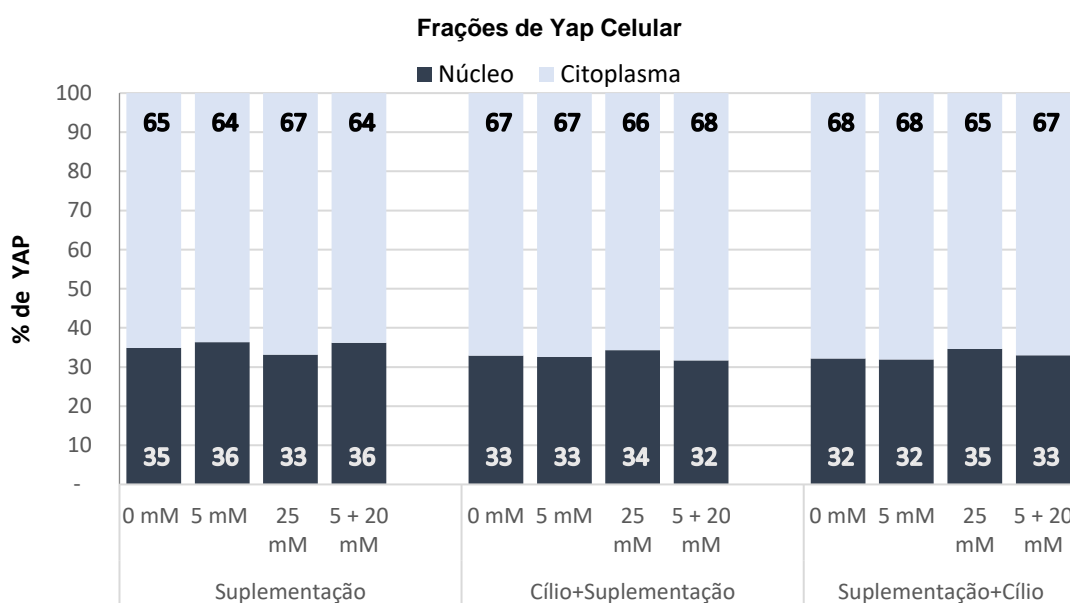
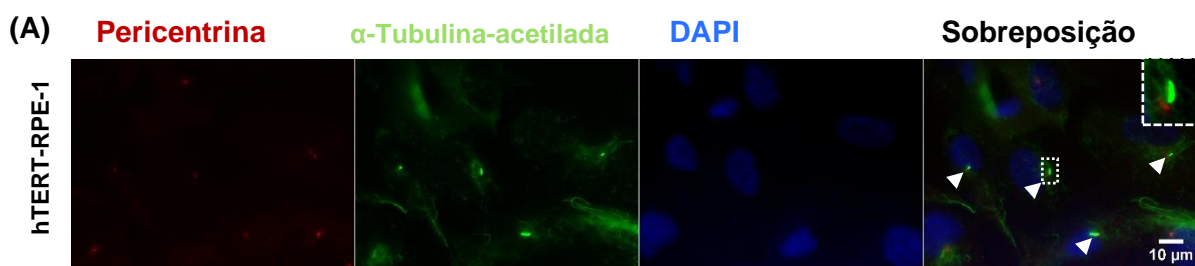


Figura 4.4. Representação gráfica da percentagem de YAP nos compartimentos citoplasmático e nuclear da célula.

Quando as células são apenas suplementadas com 0 mM, 5 mM e 25 mM de glucose e 5 mM de glucose com 20 mM de manitol ou quando foram induzidas a montar cílios primários às 24 horas e depois suplementadas com 0 mM, 5 mM e 25 mM de glucose e 5 mM de glucose com 20 mM de manitol às 48 horas ou quando suplementadas com 0 mM, 5 mM e 25 mM de glucose e 5 mM de glucose com 20 mM de manitol às 24 horas e depois induzidas a montar cílios primários às 48 horas.

Em suma, os dados obtidos demonstram que parece haver um intervalo em que o aumento de glucose leva ao aumento da expressão de YAP na célula, no entanto, em condições de glucose elevada (25 mM) esta relação deixa de existir, invertendo-se, indicando a possibilidade de existir um mecanismo de retrocontrolo negativo que leva à degradação ou menor síntese de YAP e que não é dependente da presença de cílio primário. No entanto, a presença de cílio primário parece atenuar o aumento dos níveis de YAP quando é adicionada glucose ao meio, mostrando que a eventual ativação da via Hippo aquando da formação do cílio primário, que leva à inativação e degradação do YAP, possa estar relacionado com a modulação da resposta da célula à glucose, mas o mesmo não será verdade para a resposta ao stress osmótico. Apesar do cílio parecer ter um papel na atenuação da resposta do YAP na presença de glucose, este só parece ser relevante quando está presente antes da adição da glucose ao meio. No caso da indução da formação do cílio após a exposição à glucose não se observa esta atenuação da resposta, verificando-se, pelo contrário, um aumento da expressão de YAP na célula, que pode ser causado também pelo facto da suplementação ter sido feita mais cedo, às 24 horas, e as células terem sido mantidas em cultura mais 48 horas.



(B)

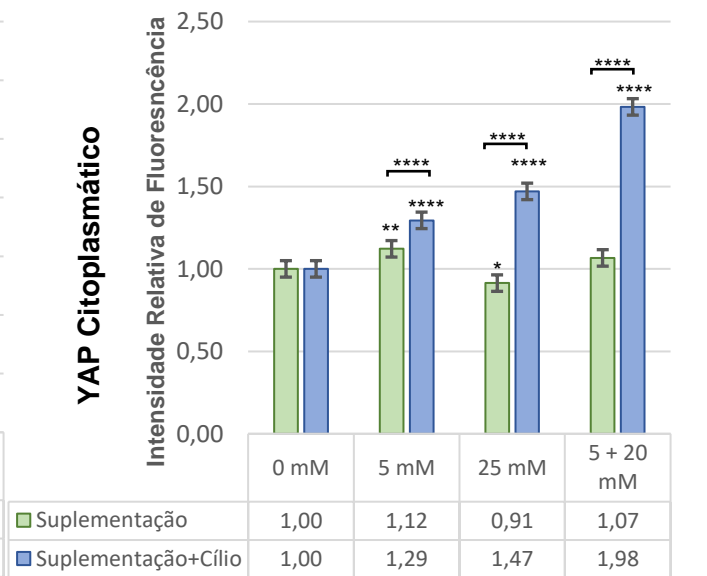
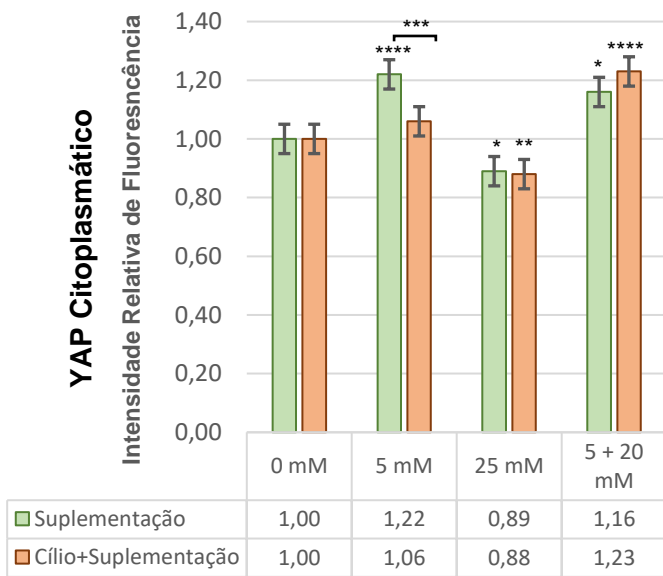
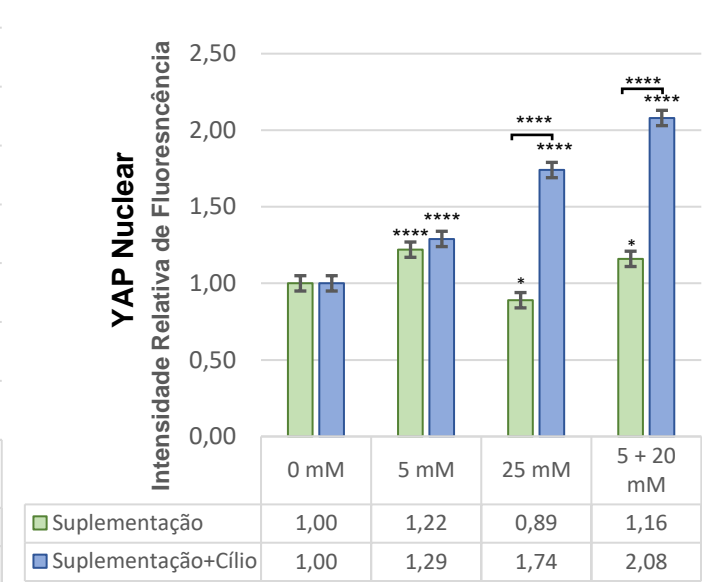
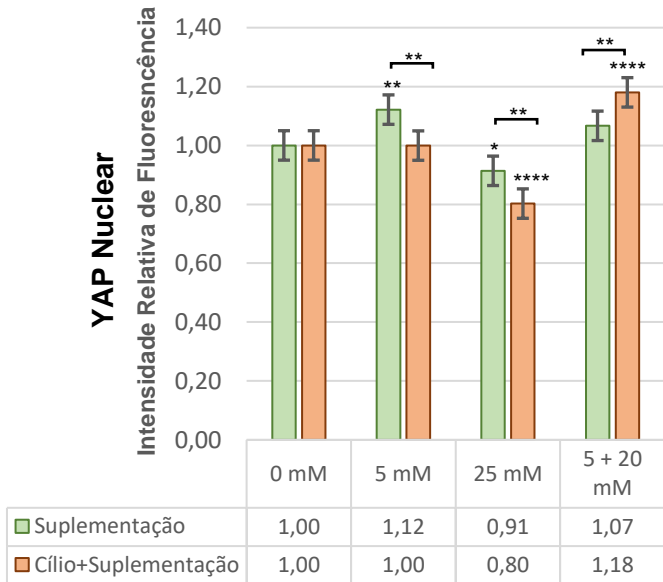
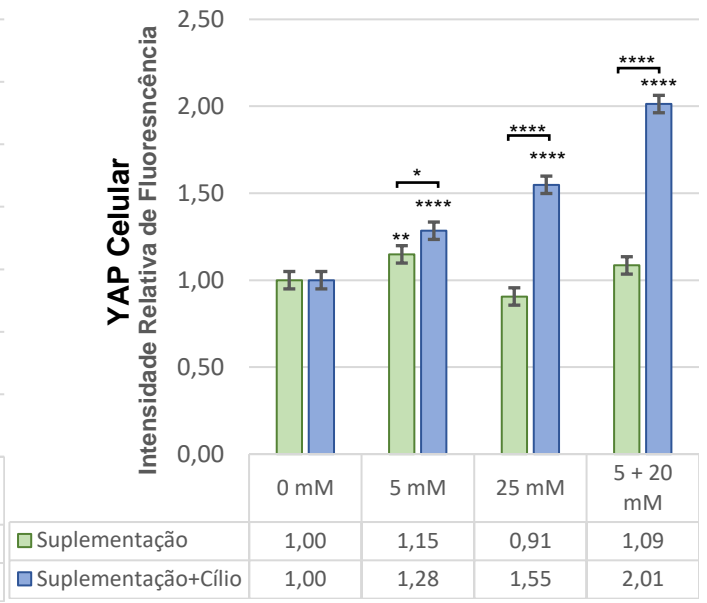
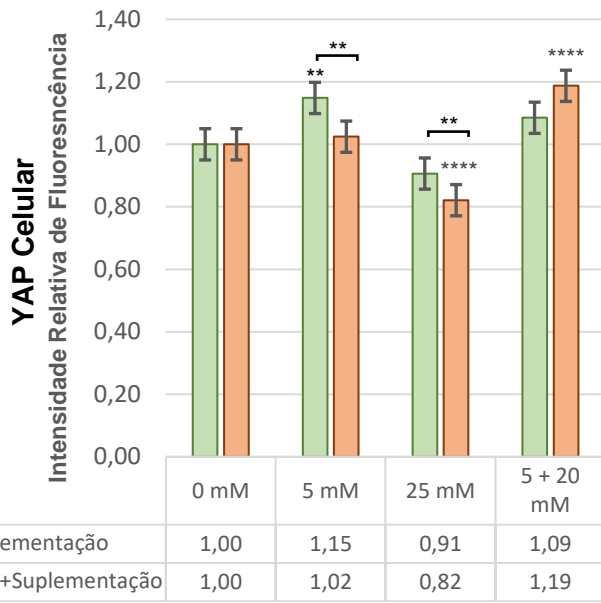
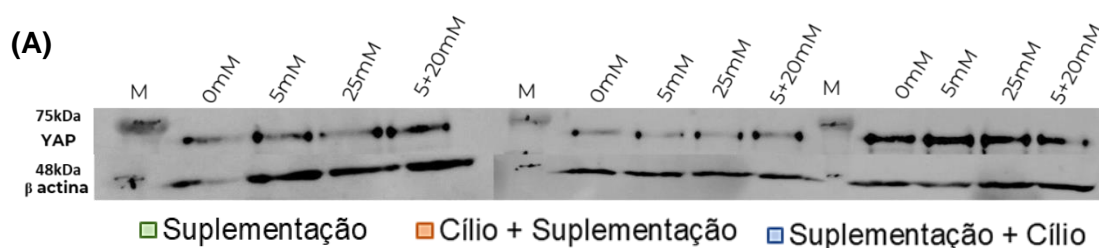


Figura 4.5. Intensidade de YAP nas hTERT-RPE-1 nas diferentes condições experimentais.

(A) Imagens representativas da marcação de α -tubulina-acetilada (axonema) e pericentrina (centrossoma/corpo basal), 24 horas após remoção do soro. As setas indicam os cílios. (B) Representação gráfica da intensidade de fluorescência relativa de YAP na célula, no compartimento nuclear e no citoplasma, quando as células foram ciliadas antes ou depois da suplementação. Os dados estão representados como média \pm intervalo de confiança a 95% de 3 experiências independentes. A variação foi considerada significativa quando o valor de p foi $<0,05$ (*), $<0,01$ (**), $<0,001$ (***) e $<0,0001$ (****).

Para complementar os resultados obtidos por imunofluorescência quantificamos os níveis de YAP celular através de *Western Blot* em extratos totais de células epiteliais pigmentadas da retina humana sujeitas a diferentes concentrações de glucose (0 mM, 5 mM, 25 mM e 5 mM+20 mM manitol) e em diferentes condições de indução de montagem de cílios primários (Suplementação, Cílios + Suplementação, Suplementação + Cílios), como descrito no ponto 3.3.1 no capítulo Materiais e Métodos. A utilização do *Western Blot*, mostrou que nos extratos proteicos totais as variações dos níveis de YAP não são muito acentuadas, no entanto, quando adicionada glucose ao meio, parece haver uma ligeira diminuição de YAP celular em todas as concentrações de glucose analisadas. Quando é induzida a montagem de cílio antes da adição de glucose a tendência parece ser contrária, havendo um ligeiro aumento nos níveis de YAP celular, em especial na condição com 20 mM de manitol. Quando o cílio é montado depois da adição de glucose este ligeiro aumento observado parece manter-se, não sendo, no entanto, tão acentuado aquando da adição de manitol (Figura 4.6. A, B).

Desta forma, percebemos que não há variações significativas nos extratos totais de proteína. Para melhorar os resultados seria importante no futuro refazer as experiências de imunofluorescência e *Western Blot*, integrando um controlo individual por experiência, que permitisse avaliar o comportamento das células quando sujeitas à suplementação simultaneamente e mantidas o mesmo tempo em cultura, para distinguir se os efeitos celulares observados são devidos à presença/ausência de cílio ou devidos aos diferentes tempos de suplementação do meio com glucose e tempo de cultura nas diferentes experiências.



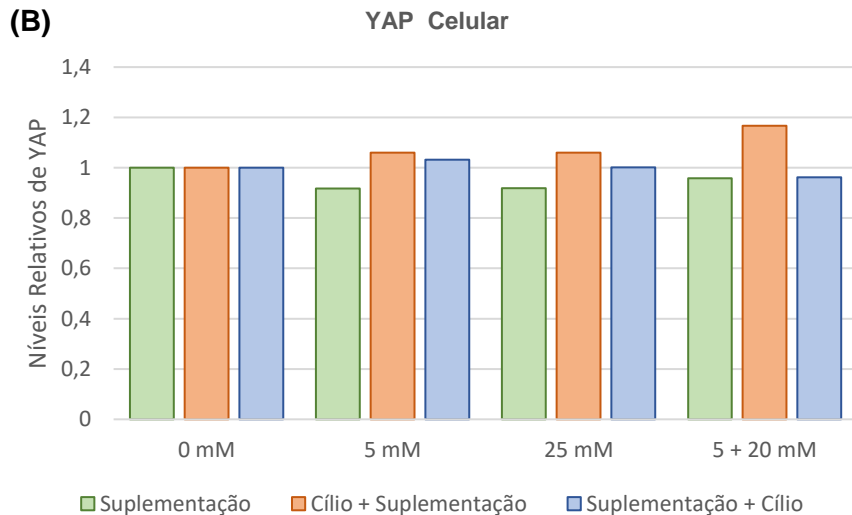


Figura 4.6. Análise por *Western Blot* dos níveis relativos de YAP celular em extratos totais de hTERT RPE-1.

(A) Análise por *Western Blot* dos níveis relativos de YAP celular em extratos totais de hTERT-RPE-1 submetidas a 0 mM, 5 mM e 25 mM de glucose e 5 mM de glucose com 20 mM de manitol, e sujeitas a indução de montagem de cílios primários antes e depois da suplementação. M representa o marcador de massa molecular. **(B)** Representação gráfica dos níveis proteicos relativos de YAP celular nas condições descritas em (A). Os resultados foram normalizados aos níveis de β -actina. Os dados representados correspondem a uma experiência.

4.2. Impacto de diferentes condições de glucose no ciclo celular em hTERT-RPE-1

Visto que a interação entre o YAP e os seus efetores no núcleo está associada à expressão de genes de progressão do ciclo celular, diferenciação e proliferação decidimos avaliar o impacto de diferentes concentrações de glucose e de montagem de cílios primários no ciclo celular das hTERT RPE-1. A análise do ciclo celular foi feita por citometria de fluxo de acordo com o descrito no ponto 3.3. no capítulo Materiais e Métodos. Para tentar relacionar a expressão de YAP na célula com o ciclo celular avaliámos as hTERT RPE-1 em condições semelhantes às descritas anteriormente, no entanto para otimização da interpretação de resultados optámos por fazer alterações na estrutura do ensaio tendo agora um controlo para cada experiência isolada, isto é, manter a experiência onde após 24 horas de incubação removemos o DMEM-F12 com FBS 10% e substituímo-lo por DMEM-F12 sem FBS 10% para permitir a montagem dos cílios primários, e depois às 48 horas adicionámos a glucose e o manitol (Cílios + Suplementação) e o respetivo controlo (Não indução de cílio + Suplementação) onde todas as condições se mantêm tirando no momento da troca do meio, onde em vez de se adicionar DMEM-F12 sem FBS 10% adicionou-se DMEM-F12 com FBS 10%. Aplicou-se a mesma lógica à outra experiência (Suplementação + Cílios) e respetivo

controle (Suplementação + Não indução de cílio) onde no primeiro se adicionou glucose e manitol às 24 horas e removeu-se o FBS 10% às 48 horas, e no último trocou-se o meio mantendo o FBS 10%. A adição de diferentes concentrações de glucose foi feita nos mesmos moldes que a experiência da marcação de YAP (0mM, 5mM, 25mM e 5mM+20mM manitol). A marcação do conteúdo de DNA das células foi feita com iodeto de propídeo, para permitir a sua quantificação e categorização pelo citômetro ao longo do ciclo celular. Para confirmar a formação de cílios adicionamos uma lamela controle em cada experiência, onde às 24 horas removemos o soro e lavamos as células com DPBS (1X), adicionando depois novo meio de cultura sem soro, no fim marcamos as células com os anticorpos anti-acetil- α -tubulina e anti-pericentrina, tendo a percentagem de montagem de cílios de 32,5% (Figura 4.7. A)

Observamos que quando foi feita a suplementação às 48 horas sem induzir previamente a formação de cílios, independentemente da sua concentração, a população de células apresenta uma tendência para diminuir o número de células em fase G1 e aumentar o número de células em fase S, não havendo alteração relevante na percentagem de células em G2. Indicando que a presença de glucose em baixas ou elevadas concentrações potencia a progressão de G1 para S (Figura 4.7. B, C).

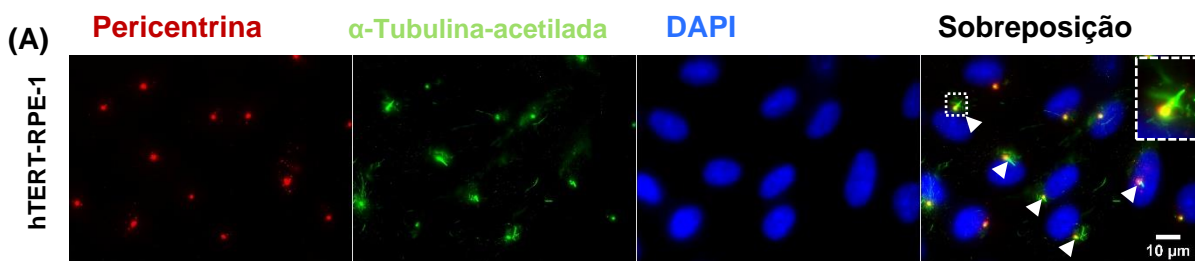
Quando induzimos a formação de cílio primário antes da suplementação com glucose, parece haver uma tendência geral, para a diminuição da percentagem de células em G1 e um ligeiro aumento na fase S e G2, indicando que o cílio contribui para uma maior progressão das células no ciclo celular, ainda que esta variação não seja significativa (Figura 4.7. B). Em comparação às células que não foram expostas a glucose, quando baixas concentrações (5mM) de glucose são adicionadas ou quando 5 mM glucose é adicionada em conjunto com o manitol o número de células em G1 diminui ligeiramente enquanto um pequeno aumento é observado na fase S. Quando não é adicionada glucose a diminuição de células em G1, distribui-se mais uniformemente entre a fase S e G2, sugerindo que a presença apenas de cílio parece potenciar o crescimento celular, replicação de DNA e divisão celular, mas quando as células são suplementadas depois com 5mM de glucose a evolução para fase G2/Mitose parece diminuir, o que pode indicar que a presença de glucose leva a uma maior retenção das células na fase S. (Figura 4.7. B). Contrariamente, quando são adicionados 25 mM de glucose a células ciliadas o ciclo celular parece ficar bloqueado em G1, havendo um aumento de células em G1 (65,5%) em relação às células não ciliadas (63,6%), e em comparação às outras concentrações de glucose na mesma experiência (0mM – 56,9%; 5mM – 54,4%; 25mM – 65,5%; 5+20mM – 53,2%) (Figura 4.7. B). Em comparação às células não ciliadas sujeitas à mesma concentração de glucose, o número de células em fase S diminui e

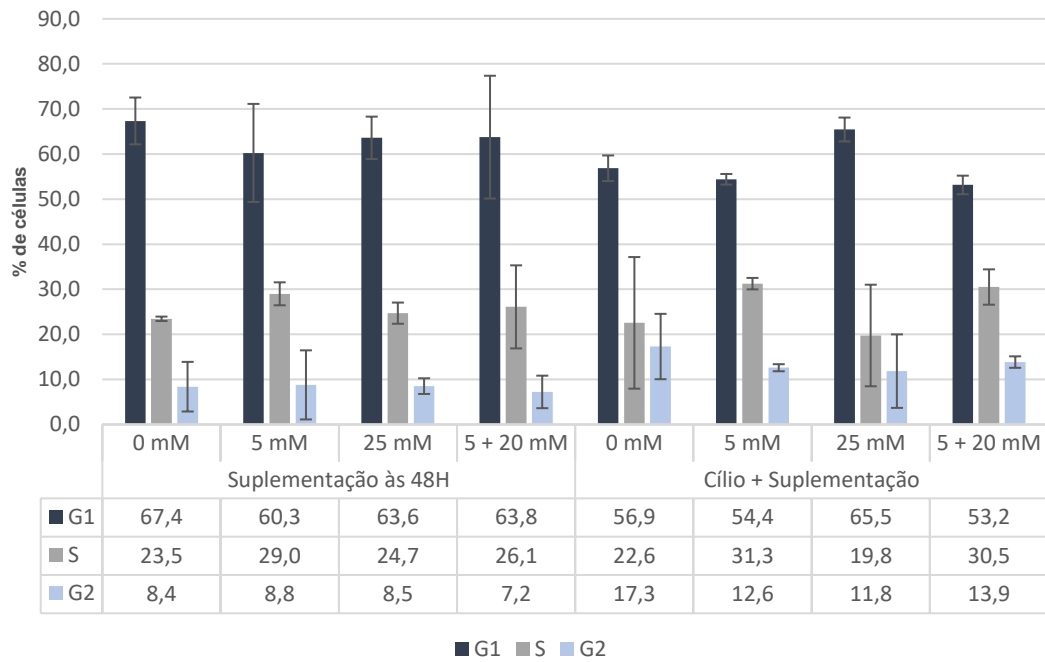
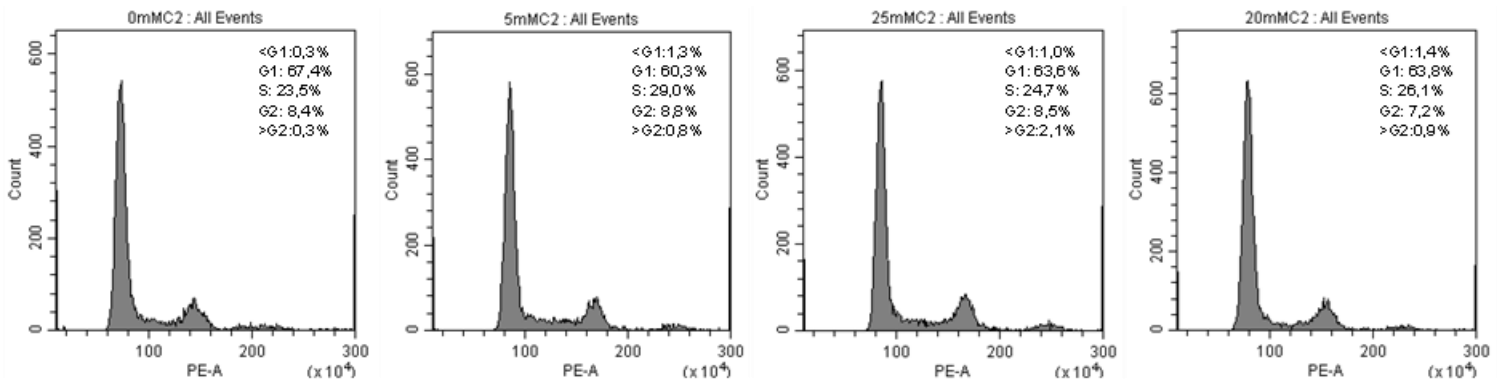
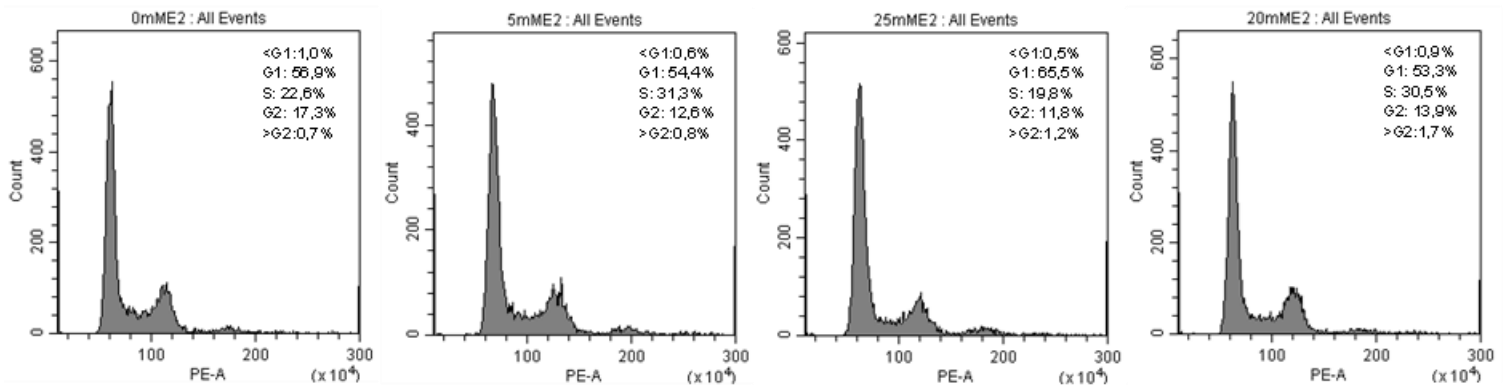
em fase G2 aumenta ligeiramente, o que está de acordo com um eventual bloqueio em G1. Nestas mesmas condições (Cílio+ 25mM de glucose) verificámos uma diminuição de YAP celular e, ainda que as variações no ciclo celular não sejam estatisticamente relevantes, pode indicar uma potencial relação entre o aumento patológico de glucose, a diminuição de marcação celular de YAP, através de eventual degradação ou menor expressão, e o bloqueio do ciclo em G1. Indicando que o cílio possa ter um papel fundamental na regulação da resposta de YAP à glucose em elevadas concentrações, e consequentemente no ciclo celular.

Quando foi feita a suplementação às 24 horas e sem indução de cílio, observa-se uma tendência idêntica à suplementação às 48 horas, mas com um ligeiro aumento de células que passam para a fase S (0mM – 25,9%; 5mM – 29,6%; 25mM – 29,5%; 5+20mM – 29,1%) e fase G2 (0mM – 11,7%; 5mM – 8,6%; 25mM – 9,2%; 5+20mM – 10%). Um efeito semelhante já tinha sido observado na expressão do YAP, denotando que o momento de exposição à glucose e o tempo que as células ficam em cultura após a mesma podem ser importantes na resposta celular e, neste caso, permitem a progressão no ciclo celular de mais células (Figura 4.7. B, C)

Quando os cílios são induzido após a suplementação de glucose observa-se um ligeiro aumento das células em fase G1 e diminuição das células na fase S em comparação às células sem indução de cílio, com exceção das células onde não foi adicionada glucose, que parecem diminuir o número de células em fase G1, não havendo alterações significativas no ciclo celular. A indução do cílio através de remoção de soro nas últimas 24 horas de cultura antes da análise pode ter induzido mais células a ficarem retidas em G1.

A análise do ciclo celular demonstrou que a variação de células em sub-G1, indicativas de apoptose, foi entre 0% e 1,4%, portanto nenhuma das condições induziu aumento de apoptose nas células.



(B)**Análise do ciclo celular****(C) Suplementação às 48 horas****(D) Cílio + Suplementação às 48 horas**

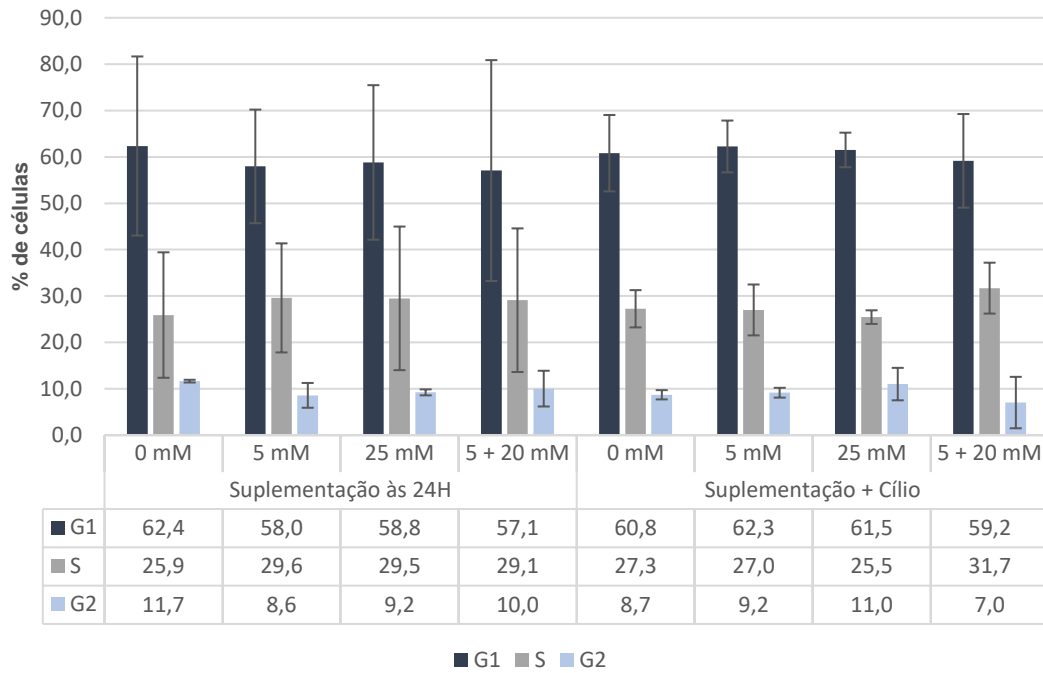
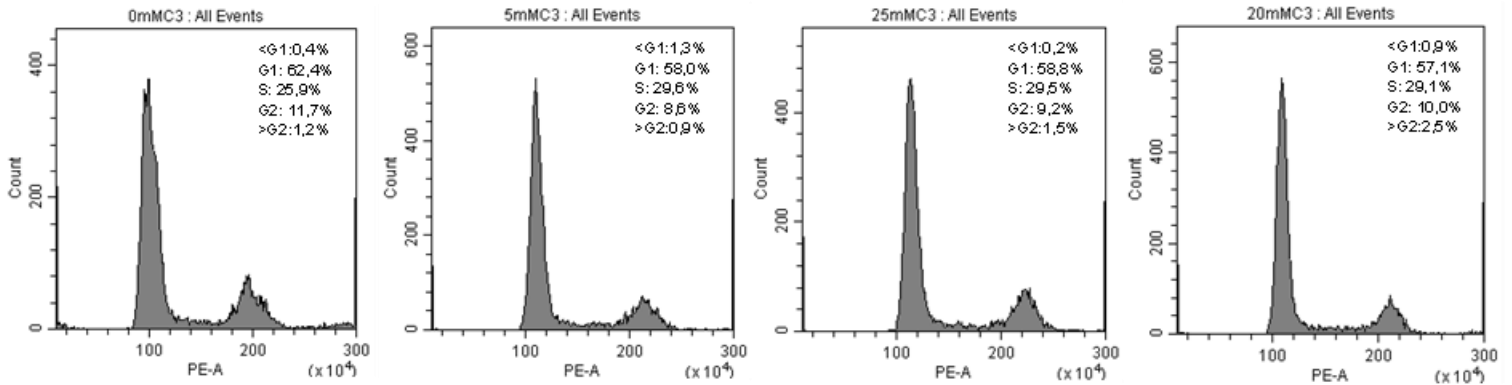
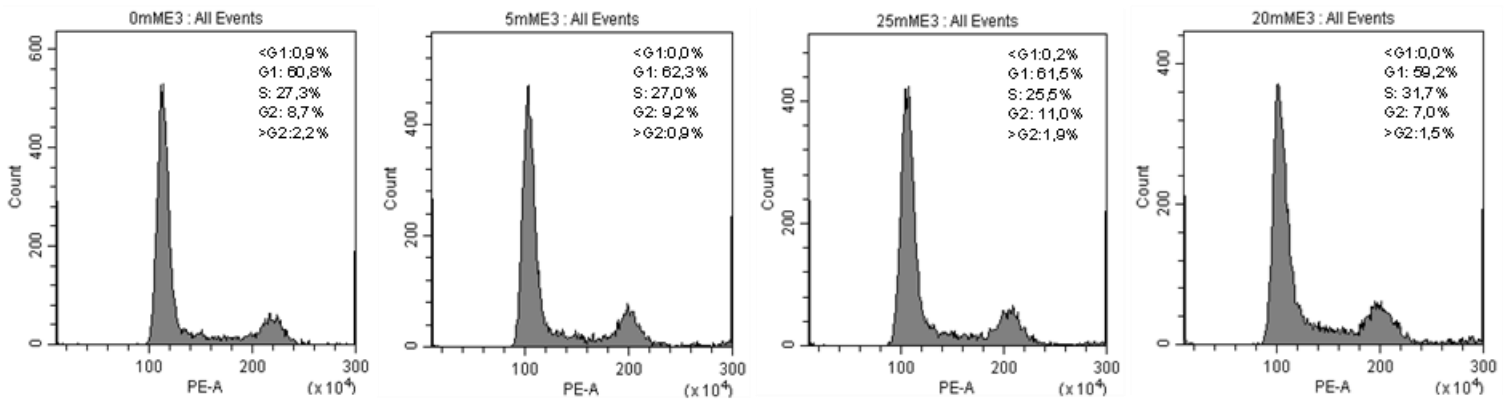
(E)**Análise do ciclo celular****(F) Suplementação às 24 horas****(G) Suplementação às 24 horas + Cílio**

Figura 4.7. Representação do ciclo celular em hTERT-RPE-1.

(A) Imagens representativas da marcação de α -tubulina-acetilada (axonema) e Pericentrina (centrossoma/corpo basal), 24 horas após remoção do soro. As setas indicam os cílios. **(B)** Representação gráfica da percentagem de células em fase G1, fase S e fase G2 do ciclo celular, em células suplementadas às 48 horas com 0 mM, 5 mM e 25 mM de glucose e 5 mM de glucose com 20 mM de manitol e em células ciliadas às 24 horas e depois suplementadas nas mesmas condições. **(C)** Histograma de frequência do conteúdo de DNA (PE-A) em células suplementadas às 48 horas com 0 mM, 5 mM e 25 mM de glucose e 5 mM de glucose com 20 mM de manitol. **(D)** Histograma de frequência do conteúdo de DNA (PE-A) de células ciliadas às 24 horas e depois suplementadas nas mesmas condições. **(E)** Histograma de frequência do conteúdo de DNA (PE-A) em células suplementadas às 24 horas com 0 mM, 5 mM e 25 mM de glucose e 5 mM de glucose com 20 mM de manitol. **(F)** Histograma de frequência do conteúdo de DNA (PE-A) em células suplementadas nas mesmas condições e depois ciliadas às 48 horas. **(G)** Representação gráfica da percentagem de células em fase G1, fase S e fase G2 do ciclo celular, em células suplementadas às 24 horas com 0 mM, 5 mM e 25 mM de glucose e 5 mM de glucose com 20 mM de manitol e em células suplementadas nas mesmas condições e depois ciliadas às 48 horas. Os dados estão representados como média \pm intervalo de confiança a 95% de 2 experiências independentes. A variação foi considerada significativa quando o valor de p foi $<0,05$ (*), $<0,01$ (**), $<0,001$ (***) e $<0,0001$ (****).

Com estes dados podemos concluir que quando se adiciona glucose em baixas concentrações no meio, quer a suplementação ocorra às 24 ou às 48 horas, verifica-se uma tendência para aumentar a percentagem de células em fase S, indicando que a presença de glucose leva a um maior número de células a progredir no ciclo celular. Esta observação é compatível com o descrito na literatura, associando a presença de glucose no meio, ao aumento da expressão de YAP, e à indução da divisão e proliferação celular. A presença de cílio antes da suplementação leva a que o efeito da glucose na passagem de células da fase G1 para S e G2 seja mais evidente. No entanto, nestas condições há uma atenuação da expressão de YAP celular, indicando que haverá outras vias de controlo glucose-cílio-ciclo celular.

Pelo contrário, a adição de elevadas concentrações de glucose no meio quando induzida a formação do cílio *à priori* parece aumentar o número de células em G1 e diminuir a fração da população correspondente a S, e aumentar em G2. Sendo possível que concentrações de glucose que simulam estados patológicos possam reter as células em G1, em provável relação com a marcada redução da expressão de YAP na célula nestas condições. Parece então que quando a célula é exposta a elevadas concentrações de glucose o cílio modula esta resposta celular, quer acentuando a retenção de células em G1 quer promovendo a diminuição dos níveis de YAP na célula. É de realçar que nenhuma destas variações é estatisticamente significativa, sendo esta apenas uma avaliação da tendência do comportamento do ciclo celular, a repetição

deste ensaio mais vezes poderá ser o suficiente para aumentar a relevância estatística do mesmo.

Através da citometria de fluxo avaliámos ainda o volume celular, através da medição da luz refratada ao longo do mesmo eixo que o laser (*Forward Scatter* – FSC), que é proporcional à área ou tamanho da superfície celular, e a sua granularidade, através da medição da luz refratada e refletida a aproximadamente 90 graus do eixo do laser (*Side Scatter* - SSC), que é proporcional à complexidade interna da célula, isto é, a presença de membrana, núcleo, organelos e grânulos aumentam a granularidade da célula e conseqüentemente o SSC (Adan et al., 2017; Liu, 2013).

Em relação ao volume celular, verificámos que quando as células são expostas às 48 horas a 5mM de glucose existe um ligeiro aumento do volume celular, em comparação às células onde não é adicionada glucose. Este aumento é mais acentuado quando a concentração de glucose aumenta para 25 mM. Na presença de manitol o volume celular não parece variar significativamente ($\bar{x}0\text{mM} - 1,00$; $\bar{x}5\text{mM} - 1,01$; $\bar{x}25\text{mM} - 1,03$; $\bar{x}5+20\text{mM} - 1,00$) (Figura 4.8. A). Quando são induzidos cílios antes da adição de glucose e é adicionada glucose a 5 mM, o volume celular mantém-se, no entanto, o volume nos 25 mM de glucose é atenuado relativamente às células não ciliadas. Em contrapartida o volume nas células onde foi adicionado simultaneamente glucose e manitol, baixa significativamente ($\bar{x}0\text{mM} - 1,00$; $\bar{x}5\text{mM} - 1,01$; $\bar{x}25\text{mM} - 1,00$; $\bar{x}5+20\text{mM} - 0,96$) (Figura 4.8. A). Mais uma vez, a presença do cílio antes da suplementação com glucose parece atenuar os efeitos da glucose na célula. No entanto a relação entre a presença do cílio e a exposição a manitol e glucose parece ser mais complexa, uma vez que a célula apresenta um comportamento diferente quando apenas exposta à glucose. O facto de a glucose ter várias formas de entrada na célula e ser uma molécula fundamental para o metabolismo celular, faz com que esta entre para a célula para ser utilizada. Em contrapartida a membrana celular é pouco permeável ao manitol, que se mantém no meio, o que provoca um efeito osmótico, levando à perda de água e diminuição do volume celular. Como já descrito na literatura o cílio parece estar associado à regulação de stress osmótico (Masyuk et al., 2006; Shiba et al., 2005; Siroky et al., 2017), e, desta forma pode acentuar esta diminuição de volume celular quando a célula está sujeita a forças osmóticas.

Quando as células são expostas às 24 horas a diferentes concentrações de glucose existe um aumento do volume celular tanto quando se adicionam 5mM ou 25mM de glucose. Resultados semelhantes são obtidos quando estas são expostas a diferentes concentrações de glucose às 48 horas, mas o aumento é mais acentuado especialmente

para os 25 mM. Quando a adição de glucose ocorre simultaneamente com a de manitol a diminuição de volume celular é clara ($\bar{x}0\text{mM} - 1,00$; $\bar{x}5\text{mM} - 1,02$; $\bar{x}25\text{mM} - 1,07$; $\bar{x}5+20\text{mM} - 0,98$) (Figura 4.8. B). Quando é induzida a formação de cílio após esta suplementação existe uma ligeira diminuição do volume quando são adicionados 25mM de glucose, mas as células mantêm-se significativamente maiores que as não suplementadas. Quando adicionados 5mM de glucose o cílio não parece alterar o tamanho, mantendo-se maior que as células não suplementadas. Estes dados indicam mais uma vez que a formação de cílio após a suplementação não parece atenuar tanto os efeitos causados pela exposição mais cedo à glucose. Observa-se ainda que quando adicionado manitol e depois formado cílio existe uma variação da tendência das células não ciliadas, aumentando o volume celular ($\bar{x}0\text{mM} - 1,00$; $\bar{x}5\text{mM} - 1,02$; $\bar{x}25\text{mM} - 1,05$; $\bar{x}5+20\text{mM} - 1,01$) (Figura 4.8. B)

Quanto à granularidade da célula parece variar da mesma forma que o tamanho quando as células são sujeitas a suplementação às 48 horas, a tendência é a mesma, aumentando ligeiramente a granularidade com o aumento da glucose (5mM e 25mM), havendo um ligeiro aumento na granularidade quando o manitol é adicionado às 48 horas ($\bar{x}0\text{mM} - 1,00$; $\bar{x}5\text{mM} - 1,03$; $\bar{x}25\text{mM} - 1,04$; $\bar{x}5+20\text{mM} - 1,01$) (Figura 4.9. A). Quando se induziu a formação de cílio antes da suplementação verificou-se uma diminuição de SSC em todas as concentrações de glucose, sendo a mais acentuada quando foi adicionado manitol ($\bar{x}0\text{mM} - 1,00$; $\bar{x}5\text{mM} - 1,00$; $\bar{x}25\text{mM} - 0,97$; $\bar{x}5+20\text{mM} - 0,91$) (Figura 4.9. A). Uma tendência semelhante à adição de glucose às 48 horas foi observada quando a glucose foi adicionada às 24 horas, observando-se, no entanto, uma diminuição significativa de granularidade quando adicionado manitol às 24 horas ($\bar{x}0\text{mM} - 1,00$; $\bar{x}5\text{mM} - 1,03$; $\bar{x}25\text{mM} - 1,03$; $\bar{x}5+20\text{mM} - 0,99$) (Figura 4.9. B). Quanto à presença de cílio após a suplementação, observa-se um efeito oposto ao cílio antes da suplementação, havendo um aumento significativo da granularidade das células nas diferentes concentrações de glucose e manitol ($\bar{x}0\text{mM} - 1,00$; $\bar{x}5\text{mM} - 1,07$; $\bar{x}25\text{mM} - 1,12$; $\bar{x}5+20\text{mM} - 1,05$) (Figura 4.9. B), mais uma vez indicando que o efeito de modelação de resposta celular pelo cílio *a priori* da suplementação não se aplica quando o cílio é induzido depois.

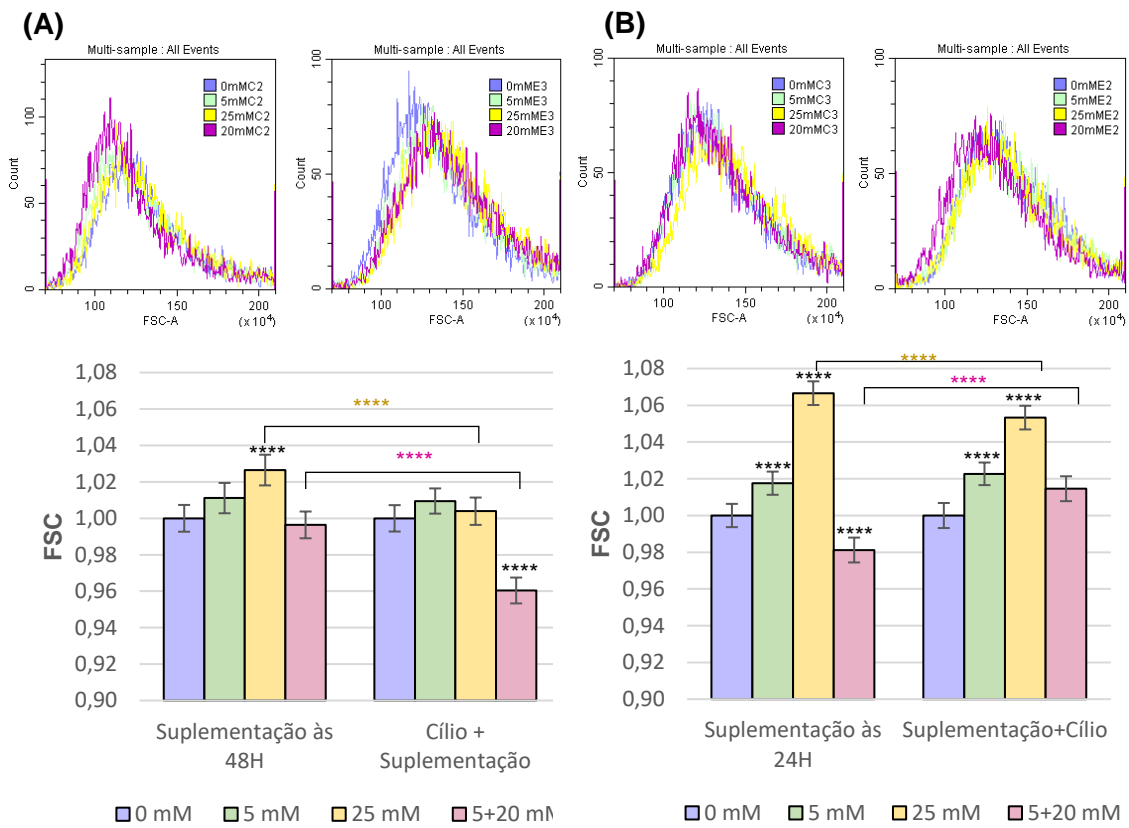


Figura 4.8. Representação gráfica do tamanho de hTERT-RPE-1

(A) Células suplementadas às 48 horas com 0 mM, 5 mM e 25 mM de glucose e 5 mM de glucose com 20 mM de manitol e em células ciliadas às 24 horas e depois suplementadas nas mesmas condições. Em cima sobreposição dos histogramas, à esquerda das células apenas suplementadas, à direita as células ciliadas antes da suplementação. **(B)** Em células suplementadas às 24 horas com 0 mM, 5 mM e 25 mM de glucose e 5 mM de glucose com 20 mM de manitol e em células suplementadas nas mesmas condições e ciliadas às 48 horas. Em cima sobreposição dos histogramas, à esquerda das células apenas suplementadas, à direita as células ciliadas depois da suplementação. Os dados estão representados como média \pm intervalo de confiança a 95% de 2 experiências independentes. Os dados estão representados como média \pm intervalo de confiança a 95% de 3 experiências independentes. A variação foi considerada significativa quando o valor de p foi $<0,05$ (*), $<0,01$ (**), $<0,001$ (***) e $<0,0001$ (****).

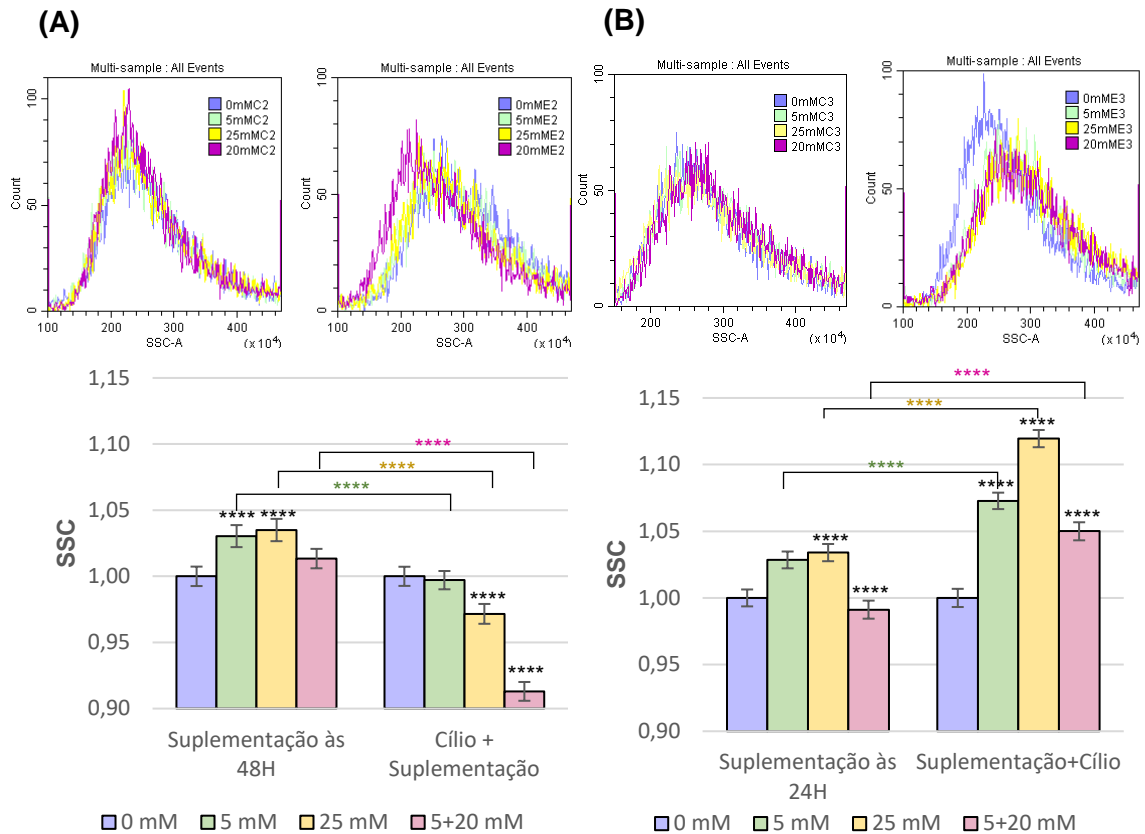


Figura 4.9. Representação gráfica da granularidade de hTERT-RPE-1

(A) Em células suplementadas às 48 horas com 0 mM, 5 mM e 25 mM de glucose e 5 mM de glucose com 20 mM de manitol e em células ciliadas às 24 horas e depois suplementadas nas mesmas condições. **(B)** Em células suplementadas às 24 horas com 0 mM, 5 mM e 25 mM de glucose e 5 mM de glucose com 20 mM de manitol e em células suplementadas nas mesmas condições e ciliadas às 48 horas. Os dados estão representados como média \pm intervalo de confiança a 95% de 2 experiências independentes. A variação foi considerada significativa quando o valor de p foi $<0,05$ (*), $<0,01$ (**), $<0,001$ (***) e $<0,0001$ (****).

4.3. Impacto de diferentes condições de glucose na expressão de γ -H2AX em hTERT-RPE-1

Na sequência da avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo, fomos avaliar a marcação por imunofluorescência da variante da histona H2AX (γ -H2AX) que é tipicamente fosforilada no resíduo Serina-139 da região C-terminal em resposta a danos na molécula de DNA (Sharma et al., 2012), no entanto, está descrita esta fosforilação da H2AX na ausência de danos no DNA, associando-se neste caso maioritariamente à senescência celular (Pospelova et al., 2009; Soutoglou, 2008; Soutoglou & Misteli, 2008).

A γ -H2AX é um marcador sensível para quebras de DNA dupla cadeia e de encurtamento de telómeros (Balajee & Geard, 2004; Redon et al., 2011; Sharma et al., 2012), por isso, o número de *foci* de γ -H2AX em células danificadas e senescentes

aumenta (Grosse Hovest et al., 2006; Sedelnikova et al., 2004), tornando esta marcação mais recentemente usada na identificação de senescência celular (Bernadotte et al., 2016). Níveis elevados de glucose têm sido associados a um aumento de *foci* de γ -H2AX, associados a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio e a mais danos no DNA (Tanaka et al., 2006; Zhong et al., 2018). Por outro lado, a senescência celular relaciona-se com a expressão de YAP, sendo que a inibição de YAP está associada a indução de senescência e a sua sobreexpressão associada a diminuição da senescência (Jia et al., 2018; Xie et al., 2013). A utilização da γ -H2AX é importante no contexto do presente trabalho para perceber se o excesso de glucose, que está a induzir a degradação de YAP celular e provavelmente a retenção de células em G1, estaria também a induzir danos no DNA e/ou senescência celular.

Para avaliar a presença de danos no DNA observámos a expressão de γ -H2AX no núcleo em hTERT-RPE-1 sujeitas a diferentes concentrações de glucose (0mM, 5mM, 25mM e 5mM+20mM manitol) e em diferentes condições de montagem de cílios (Não indução de cílio + Suplementação, Cílio + Suplementação, Suplementação + Não indução de cílio, Suplementação + Cílio), como descrito no ponto 3.2.1 no capítulo Materiais e Métodos. Avaliámos a variação de expressão de γ -H2AX no núcleo por quantificação da intensidade da imunofluorescência onde marcámos as células com o anticorpo anti- γ -H2AX e anti-pericentrina, e o DNA dos núcleos com DAPI de forma a podermos determinar as áreas correspondentes ao compartimento nuclear. Posteriormente, fizemos a caracterização dos *foci* de γ -H2AX, para avaliar a reparação de danos na dupla cadeia de DNA, e da marcação total de γ -H2AX no núcleo, pois para além da marcação mais comum de *foci*, também existem células que apresentam o núcleo totalmente marcado com γ -H2AX (pan-nuclear), este fenómeno está geralmente associado a situações de stress replicativo letal e apoptose (Moeglin et al., 2019), neste caso fizemos a quantificação total de γ -H2AX no núcleo, que inclui a intensidade dos *foci* e da marcação pan-nuclear.

Em relação à caracterização dos *foci* de γ -H2AX, verificámos que em células expostas às 48 horas a diferentes concentrações de glucose, com 5mM de glucose há um ligeiro aumento da intensidade dos *foci* de γ -H2AX no núcleo em comparação às células onde não foi adicionada glucose. Quando adicionados 25 mM de glucose ou 20 mM manitol mais 5 mM glucose a marcação de γ -H2AX no núcleo baixa significativamente (0mM – 1,00; 5mM – 0,95; 25mM – 1,01; 5+20mM – 0,90) (Figura 4.10. A, C).

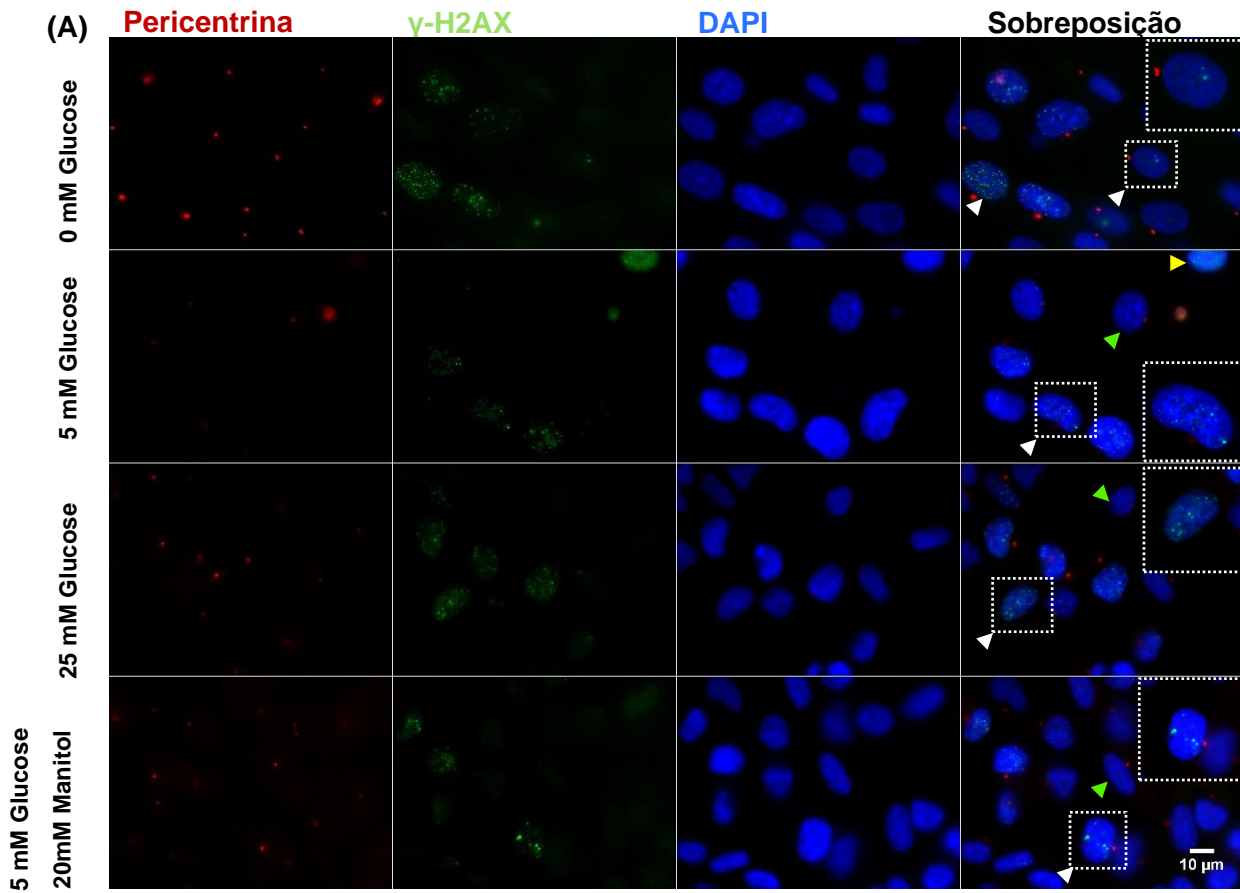
A presença de cílios antes da adição de glucose parece uniformizar a intensidade dos *foci* de γ -H2AX no núcleo. No caso da adição de 5mM de glucose com e sem o manitol,

há uma diminuição da expressão de γ -H2AX em comparação às células onde não foi adicionada glucose. Por outro lado, quando adicionados 25mM de glucose não há variação significativa em relação aos 0 mM (0mM -1,00; 5mM - 0,95; 25mM - 1,01; 5+20mM -0,90). No entanto, em comparação às células em que não foram induzidos cílios antes da suplementação, todos os valores variam menos (Figura 4.10. B, C).

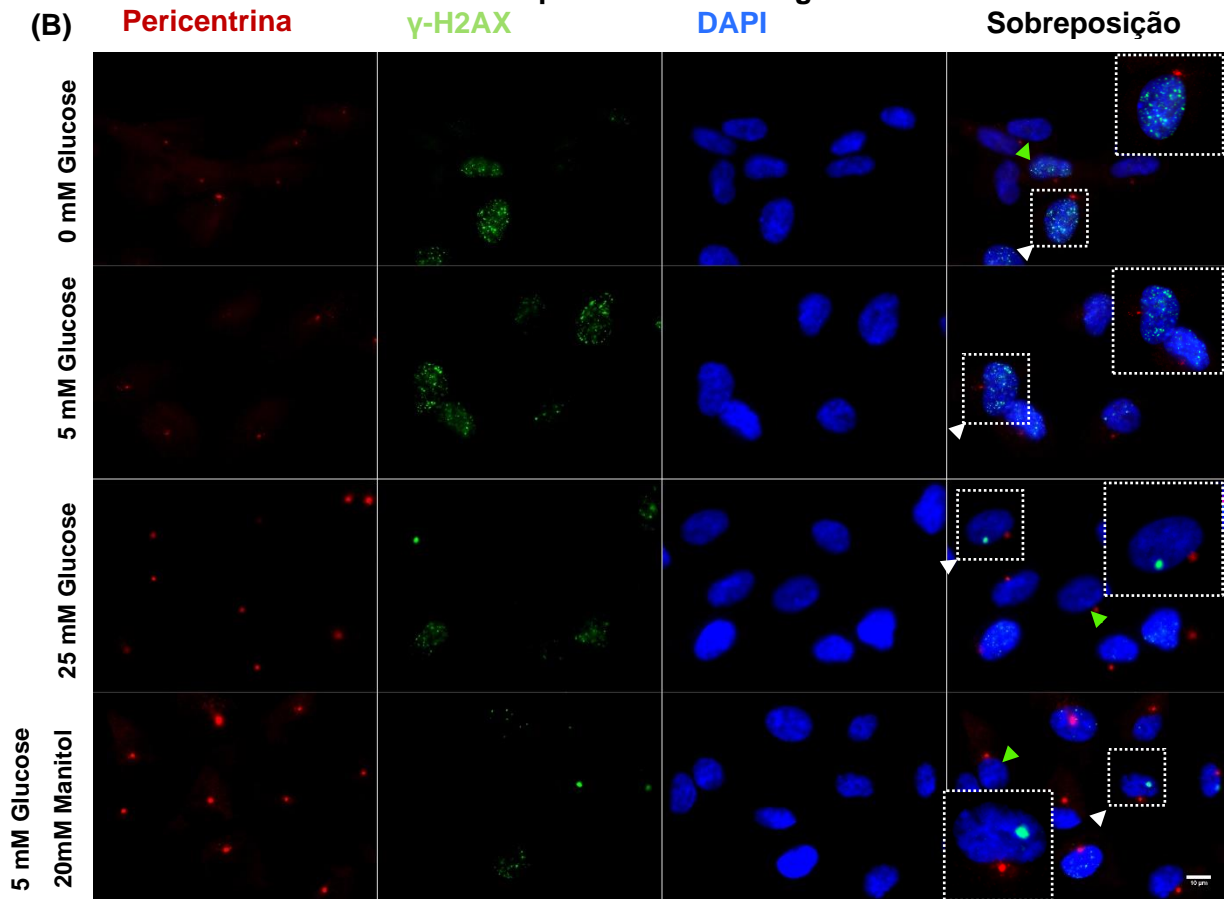
Quanto à marcação total de γ -H2AX no núcleo, quando as células são expostas às 48 horas a 5mM de glucose há um aumento significativo da expressão total de γ -H2AX no núcleo, ao invés, a adição de 25mM de glucose e de 5 mM de glucose com manitol, leva a uma menor expressão de γ -H2AX, como já observado para os *foci* de γ -H2AX, neste caso, de uma forma mais acentuada quando o manitol é adicionado (0 mM -1,00; 5 mM - 1,18; 25 mM - 0,89; 5 mM+20 mM -0,54) (Figura 4.10. A, D).

Quando é induzida a formação de cílios antes da suplementação, verificamos que na adição de apenas glucose (5mM e 25mM) há uma diminuição da intensidade total de γ -H2AX, no caso da adição de glucose mais manitol verifica-se a tendência oposta, aumentando a intensidade em comparação à experiência sem cílios, no entanto, mantendo-se abaixo das células que não foram suplementadas (Figura 4.10. A, D). Nesta experiência, ao suplementar as células ciliadas observa-se que em todas as concentrações há uma diminuição de intensidade da γ -H2AX em relação às células que não foram suplementadas, sendo que só é significativa quando são adicionados 25mM de glucose (0mM -1,00; 5mM - 0,85; 25mM - 0,72; 5 mM+20 mM -0,84) (Figura 4.10. D). Conclui-se assim, mais uma vez, que a presença de cílios antes da suplementação tende a aproximar os níveis da expressão de γ -H2AX no núcleo aos encontrados nas células sem cílios.

Células não ciliadas e suplementadas com glucose às 48 horas



Células ciliadas e suplementadas com glucose às 48 horas



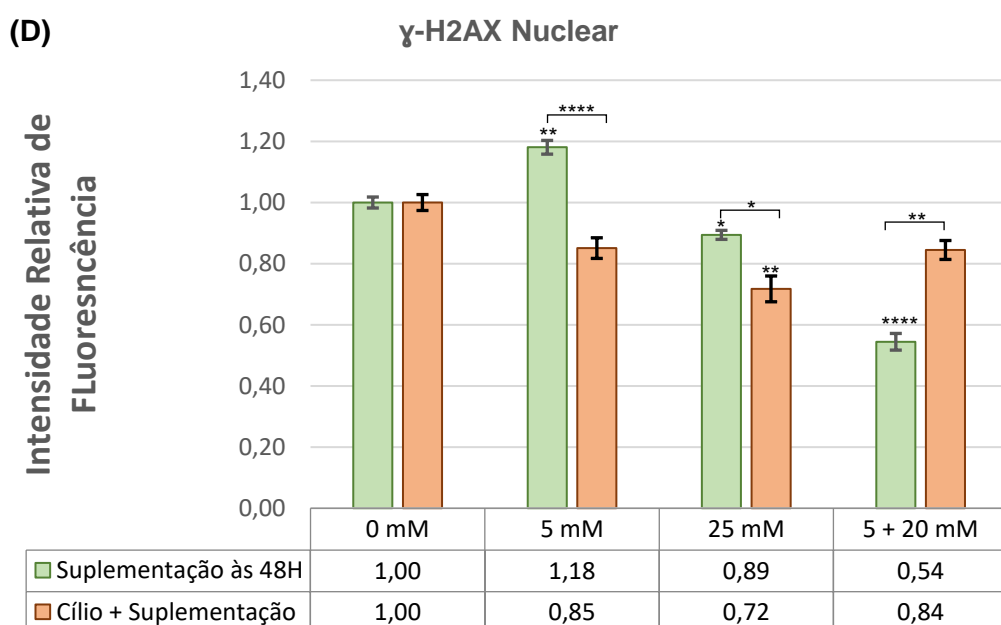
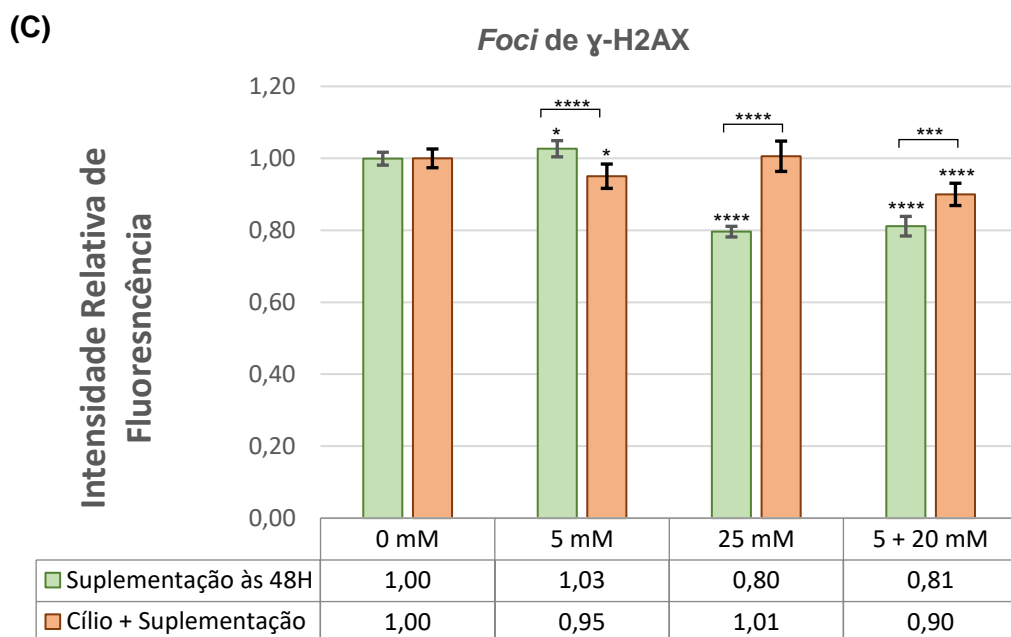


Figura 4.10. Intensidade de γ -H2AX em hTERT-RPE-1

(A) Imagens representativas da marcação de γ -H2AX quando submetidas a 0 mM, 5 mM e 25 mM de glucose e 5 mM de glucose com 20 mM de manitol às 48 horas. **(B)** Imagens representativas da marcação de γ -H2AX quando ciliadas às 24 horas e submetidas a 0 mM, 5 mM e 25 mM de glucose e 5 mM de glucose com 20 mM de manitol às 48 horas. Para análise destas células utilizaram-se os anticorpos anti- γ -H2AX e anti-pericentrina. O DNA foi marcado com DAPI. Setas a branco indicam núcleos com *foci* de γ -H2AX, setas a amarelo indicam núcleo com marcação total γ -H2AX no núcleo, setas a verde indicam núcleos sem marcação de γ -H2AX. **(C)** Representação gráfica da intensidade de fluorescência relativa de *foci* de γ -H2AX no núcleo nas mesmas condições que (A) e (B). **(D)** Representação gráfica da intensidade de fluorescência relativa de γ -H2AX total no núcleo de hTERT RPE-1 nas mesmas condições que (A) e (B). Os dados estão representados como média \pm intervalo de confiança a 95% de 3 experiências independentes. A variação foi considerada significativa quando o valor de p foi $<0,05$ (*), $<0,01$ (**), $<0,001$ (***) e $<0,0001$ (****).

Em contraste, quando as células são expostas à glucose às 24 horas sem presença de cílios, todas as condições de suplementação levam ao aumento significativo de expressão de γ -H2AX, indicando mais uma vez que o aumento do tempo de cultura após exposição à glucose é fundamental na alteração da resposta celular, neste caso maior tempo aumenta a expressão do marcador de senescência celular e de danos no DNA. O aumento é maior no caso das células que foram expostas a uma concentração de 25mM de glucose (0mM -1,00; 5mM - 1,24; 25mM - 1,43; 5+20mM - 1,21) (Figura 4.11. A, C)

Quando a indução do cílio é estimulada após a adição de glucose, verifica-se novamente uma uniformização da expressão dos *foci* de γ -H2AX no núcleo. Quando são adicionados 5mM e 25mM de glucose há um aumento da intensidade de *foci* de γ -H2AX, e uma diminuição quando adicionado 20 mM manitol em simultâneo com 5mM glucose (0mM -1,00; 5mM - 1,12; 25mM - 1,10; 5+20mM -0,94). Em comparação às células apenas suplementadas verifica-se uma diminuição geral da expressão de γ -H2AX, revelando um potencial papel no cílio na diminuição da senescência e de possíveis danos celulares causados pela presença de glucose (Figura 4.11. B, C).

Quanto à marcação total de γ -H2AX no núcleo, quando apenas é feita a suplementação há um aumento da expressão de γ -H2AX quando adicionados 25 mM de glucose, sendo que nas células onde são adicionados 5 mM de glucose com e sem manitol a expressão não é significativamente diferente das células não expostas à glucose (0mM -1,00; 5mM - 1,02; 25mM - 1,49; 5+20mM -0,97) (Figura 4.11. A, D).

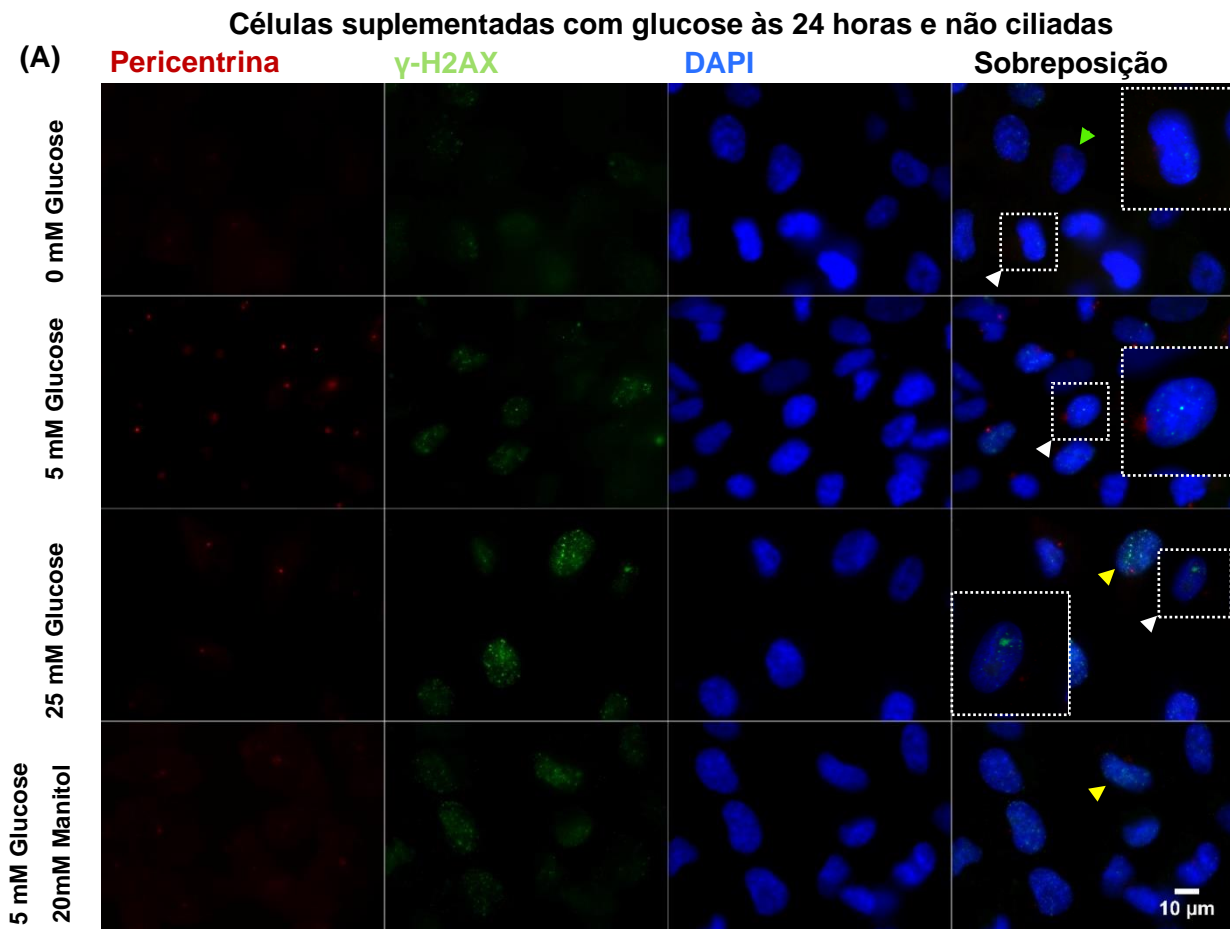
A formação de cílios após a suplementação leva a um aumento da intensidade de γ -H2AX quando adicionados 5 mM de glucose, e uma ligeira diminuição quando adicionado manitol mais 5 mM de glucose. Nos 25 mM a intensidade decresce, mas mantém-se elevada (0mM -1,00; 5mM - 1,31; 25mM - 1,34; 5+20mM -0,81) (Figura 4.11. B, D). Nesta experiência a adição de 5 mM ou 25 mM de glucose e posterior montagem de cílios leva ao aumento significativo da intensidade total de γ -H2AX, enquanto na glucose mais manitol os cílios levam à diminuição mais acentuada relativamente quer à ausência de cílios, que à ausência de glucose (Figura 4.11. D).

Comparando as duas experiências, a presença de cílio antes da suplementação parece levar à diminuição de expressão total de γ -H2AX, enquanto a presença de cílio após a suplementação parece levar ao seu aumento, com exceção da adição de manitol, que parece em geral diminuir a expressão de γ -H2AX. Ao contrário dos *foci* onde a presença de cílios antes ou depois da suplementação parece normalizar a sua expressão, na

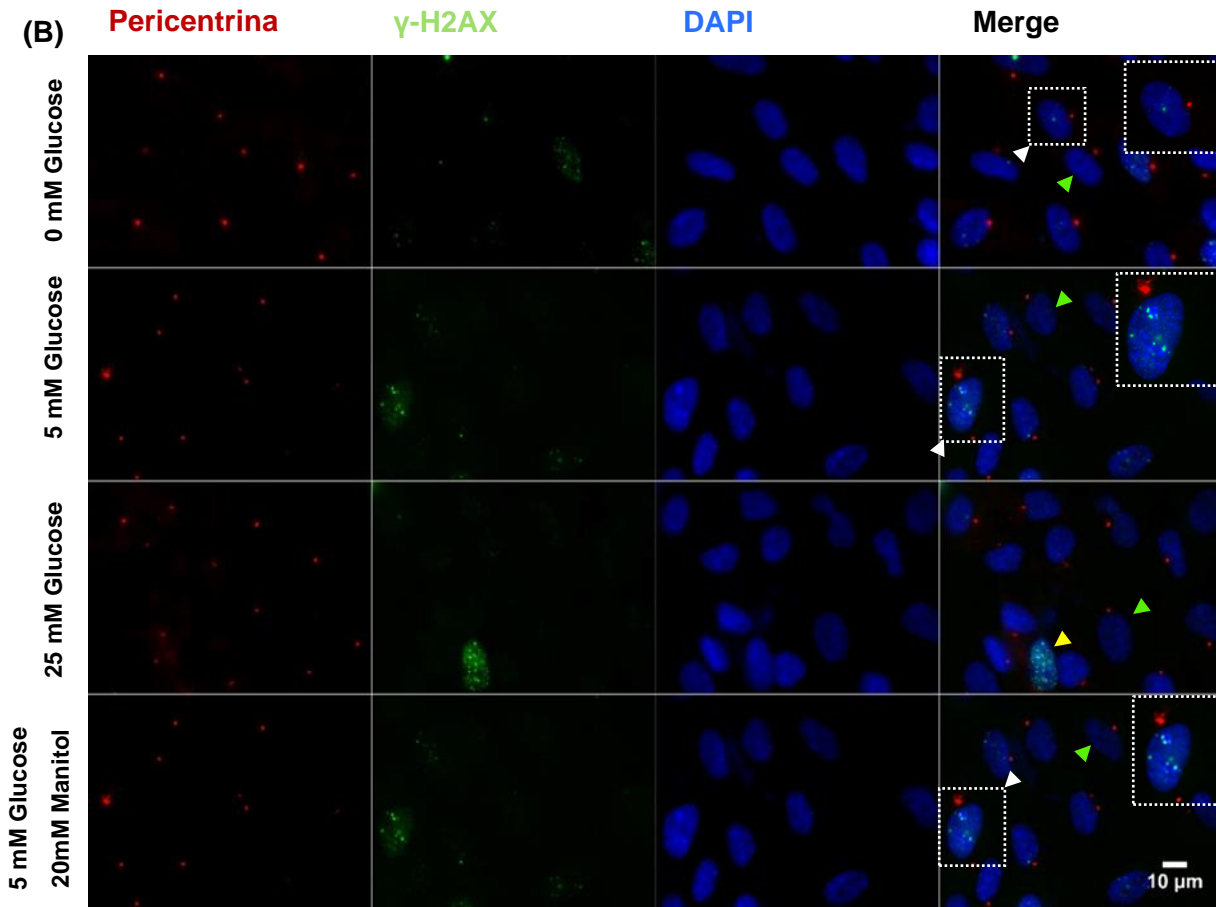
marcação total de γ -H2AX no núcleo apenas a presença de cílios antes parece ter esse papel.

Os resultados anteriores mostram que quando a suplementação é feita às 24 horas e principalmente na ausência de cílio há um aumento significativo da intensidade de *foci* e total de γ -H2AX, indicando que a presença de elevadas concentrações de glucose no meio pode levar a danos da dupla cadeia de DNA e/ou senescência. O facto de os cílios após a suplementação conseguirem atenuar a expressão de *foci* de γ -H2AX, mas não da sua marcação total, pode indicar que as células expostas à glucose às 24 horas estão a sofrer outro tipo de danos que o cílio não consegue regular. Por outro lado, quando o cílio é induzido antes da glucose parece conseguir regular tanto os níveis da intensidade de *foci* como da intensidade total de γ -H2AX.

Não observámos um aumento de γ -H2AX nas células ciliadas e suplementadas com 25mM como esperado, indicando que a diminuição da expressão de YAP nas células nesta condição leva a uma tendência para aumentar de células em G1, mas não para aumentar a senescência nem os danos celulares, podendo neste caso o cílio estar a contribuir para a moderação deste efeito.

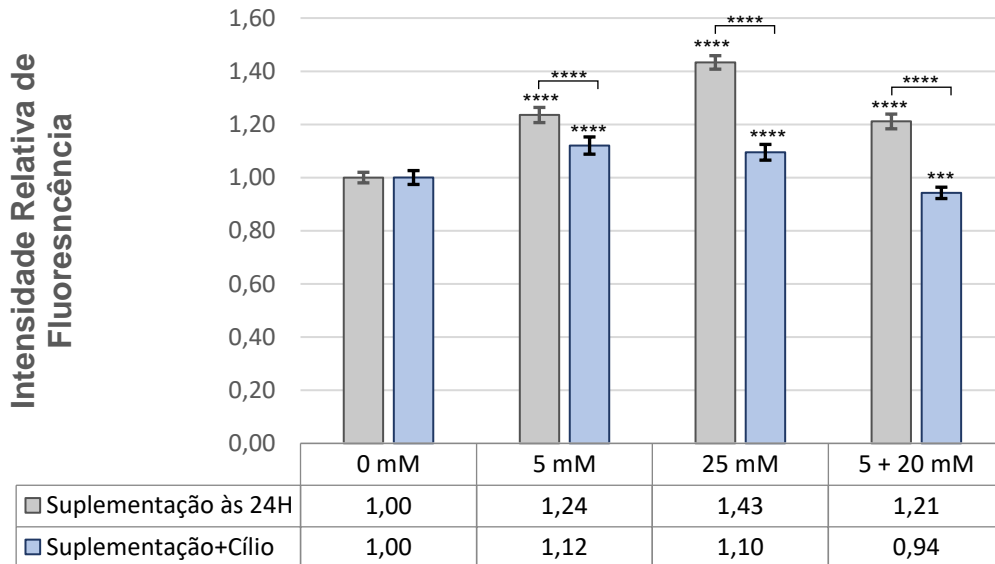


Células suplementadas com glucose às 24 horas e ciliadas



(C)

Foci de γ -H2AX



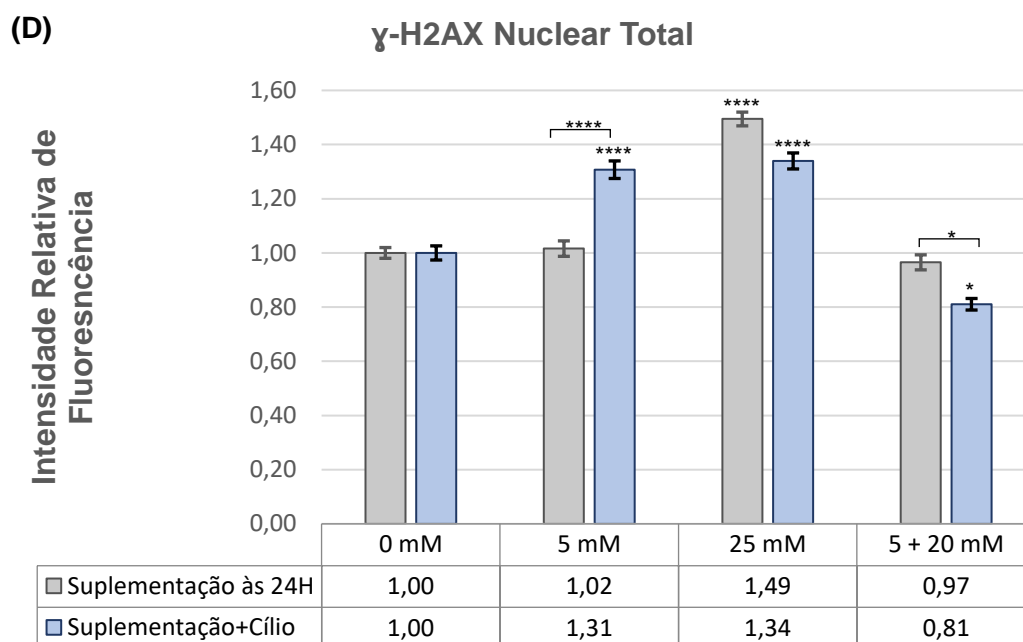


Figura 4.11. Intensidade de γ -H2AX em hTERT-RPE-1

(A) Imagens representativas da marcação de γ -H2AX quando submetidas a 0 mM, 5 mM e 25 mM de glucose e 5 mM de glucose com 20 mM de manitol às 24 horas. **(B)** Imagens representativas da marcação de γ -H2AX quando submetidas a 0 mM, 5 mM e 25 mM de glucose e 5 mM de glucose com 20 mM de manitol às 24 horas e ciliadas às 48 horas de cultura. Para análise destas células utilizaram-se os anticorpos anti- γ -H2AX e anti-pericentrina. O DNA foi marcado com DAPI. Setas a branco indicam núcleos com *foci* de γ -H2AX, setas a amarelo indicam núcleo com marcação total γ -H2AX no núcleo, setas a verde indicam núcleos sem marcação de γ -H2AX. **(C)** Representação gráfica da intensidade de fluorescência relativa de *foci* de γ -H2AX no núcleo nas mesmas condições que (A) e (B). **(D)** Representação gráfica da intensidade de fluorescência relativa de γ -H2AX total no núcleo nas mesmas condições que (A) e (B). Os dados estão representados como média \pm intervalo de confiança a 95% de 3 experiências independentes. A variação foi considerada significativa quando o valor de p foi <0,05 (*), <0,01 (**), <0,001 (***) e <0,0001 (****).

Quantificámos também o número de *foci* de γ -H2AX por núcleo para percebermos se as células nas diferentes condições apresentavam maior acumulação de *foci* de γ -H2AX em cada núcleo. Sendo que a tendência quando adicionada glucose às 48 horas é para diminuir o número de *foci* de γ -H2AX por núcleo nas células suplementadas em comparação às células onde não houve adição de glucose nem manitol, relacionando-se com a intensidade dos *foci* na mesma condição, no entanto, a única variação significativa é o decréscimo do número de *foci* quando é adicionada glucose com 20 mM de manitol (Figura 4.12. A). Quando as células foram ciliadas antes da adição de glucose, a tendência mantém-se igual às não ciliadas, com exceção de quando é adicionado manitol, que leva a uma inversão da tendência, aumentando significativamente a expressão em relação à adição de manitol sem cílios. Verifica-se também uma diminuição significativa do número de *foci* de γ -H2AX quando adicionados

25 mM de glucose em comparação às células onde não foi adicionada glucose (Figura 4.12. A). Em geral, parece que a presença de cílio leva ao aumento do número de *foci* de γ -H2AX em cada núcleo, com exceção dos 25 mM, em que mantém o número (Figura 4.12. A, B).

Quando a suplementação foi feita às 24 horas mantém-se a tendência da adição de glucose diminuir o número de *foci* de γ -H2AX por núcleo, com exceção da suplementação com 25 mM de glucose, que parece aumentar ligeiramente, mas estas variações não são significativas (Figura 4.12. C). Quando as células foram ciliadas após a suplementação parece haver uma aproximação dos valores do número de *foci* de γ -H2AX nas diferentes condições, havendo uma diminuição significativa do número de *foci* quando não há adição de glucose e quando adicionados 25 mM de glucose (Figura 4.12. D).

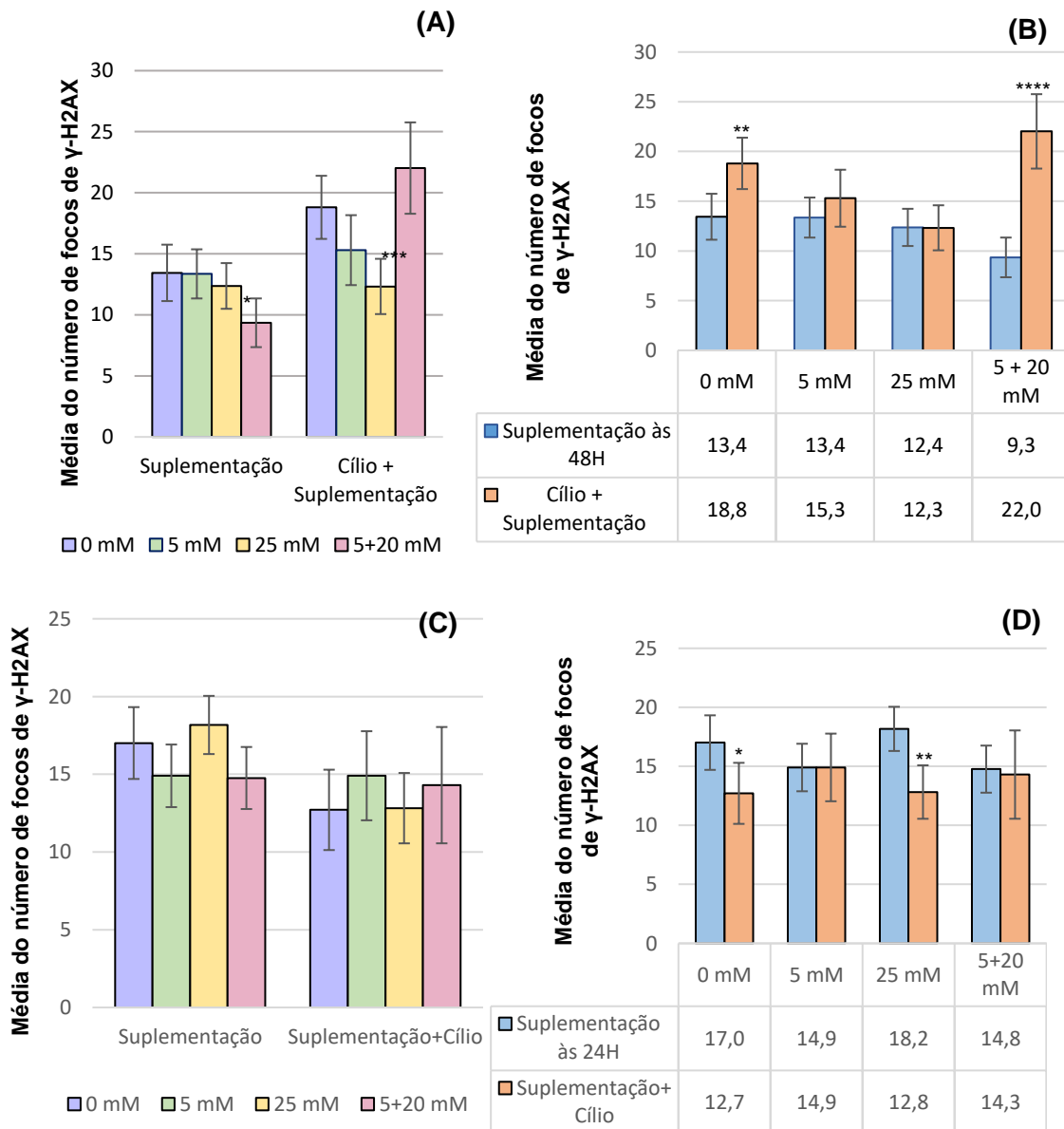


Figura 4.12. Representação gráfica da média do número de focos de γ -H2AX em células hTERT RPE-1.

(A) Gráfico comparativo entre a experiência controle (Suplementação) e a experiência (Cílio+Suplementação), para cada concentração de glucose/manitol. **(B)** Gráfico comparativo das diferentes concentrações de glucose/manitol dentro de cada experiência (Suplementação; Cílio+Suplementação). **(C)** Gráfico comparativo entre a experiência controle (Suplementação) e a experiência (Suplementação+Cílio), para cada concentração de glucose/manitol. **(D)** Gráfico comparativo das diferentes concentrações de glucose/manitol dentro de cada experiência (Suplementação; Suplementação+Cílio). Os dados estão representados como média \pm intervalo de confiança a 95% de 3 experiências independentes. Os dados estão representados como média \pm intervalo de confiança a 95% de 3 experiências independentes. A variação foi considerada significativa quando o valor de p foi $<0,05$ (*), $<0,01$ (**), $<0,001$ (***) e $<0,0001$ (****).

Foi também calculada a percentagem de núcleos que apresentavam *foci* de γ -H2AX em relação ao número total de núcleos observados. Para esta relação não parece haver uma variação significativa entre experiências. No entanto, quando é feita suplementação com glucose às 48 horas (0mM –61,3%; 5mM – 62,3%; 25mM – 66,0%; 5+20mM –40,7) verifica-se uma tendência para diminuir o número de núcleos com *foci* de γ -H2AX quando adicionado glucose mais manitol (Figura 4.13. A)

Nas células ciliadas antes da suplementação, parece haver uma tendência para diminuir a percentagem de núcleos com *foci* de γ -H2AX em comparação às não suplementadas com glucose (0mM –68,7%; 5mM – 55,3%; 25mM – 55,3%; 5+20mM –56,0%) (Figura 4.13. A). Em comparação às células que não foram ciliadas parece haver uma diminuição de núcleos marcados quando adicionados 5mM e 25mM de glucose, e um aumento quando não há suplementação ou quando há adição de manitol (Figura 4.13. B).

Quando a suplementação foi feita às 24 horas (0mM –68,7%; 5mM – 62,0%; 25mM – 68,0%; 5+20mM –55,7%) a tendência para diminuir o número de núcleos com *foci* de γ -H2AX quando adicionado glucose mais manitol mantém-se, não sendo tão grande a variação (Figura 4.13. C).

Quando as células são suplementadas antes de serem ciliadas também aumenta mais a percentagem de células com *foci* quando são adicionados 5mM de glucose sem manitol (0mM – 55,0%; 5mM – 64,3%; 25mM – 51,3%; 5+20mM –56,0%). Em comparação às células não ciliadas a presença de cílios depois da suplementação parece diminuir o número de células com *foci* de γ -H2AX quando não é adicionada glucose e quando são adicionados 25mM de glucose, já no controlo de manitol a percentagem de cílios mantém-se e quando adicionados 5 mM de glucose a tendência é aumentar o número de células com *foci* (Figura 4.13. D)

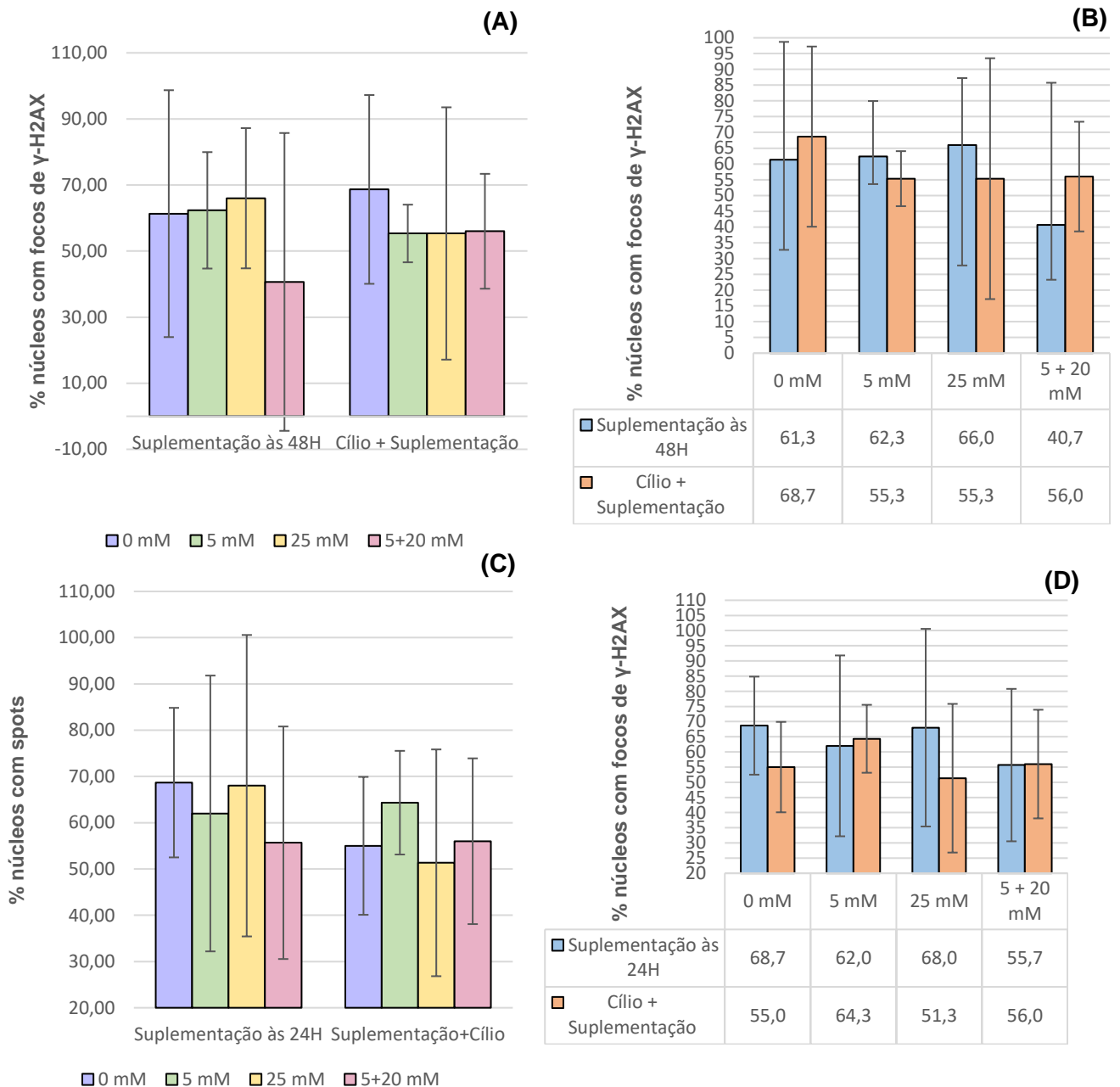


Figura 4.13. Representação gráfica da percentagem de núcleos com focos de γ -H2AX em células hTERT-RPE-1.

(A) Gráfico comparativo entre a experiência controlo (Suplementação) e a experiência (Cílio+Suplementação), para cada concentração de glucose/manitol. (B) Gráfico comparativo das diferentes concentrações de glucose/manitol dentro de cada experiência (Suplementação; Cílio+Suplementação). (C) Gráfico comparativo entre a experiência controlo (Suplementação) e a experiência (Suplementação+Cílio), para cada concentração de glucose/manitol. (D) Gráfico comparativo das diferentes concentrações de glucose/manitol dentro de cada experiência (Suplementação; Suplementação+Cílio). Os dados estão representados como média \pm intervalo de confiança a 95% de 3 experiências independentes. A variação foi considerada significativa quando o valor de p foi $<0,05$ (*), $<0,01$ (**), $<0,001$ (***) e $<0,0001$ (****).

4.4. Análise bioinformática da sequência genética de *ALMS1*

Um dos objetivos do presente estudo era avaliar como variantes da *ALMS1* influenciam a montagem e funcionalidade dos cílios. Foram identificadas novas variantes no gene *ALMS1* (Ginete et al., 2021) numa população portuguesa de indivíduos obesos, uma das variantes era *ALMS1* c.5552C>T.

O servidor *AlphaFold2* permitiu prever que a variante c.5552C>T no gene *ALMS1* origina uma alteração *missense* no exão 8, hotspot de mutações do gene *ALMS1*, onde uma Prolina é substituída por uma Leucina na posição 1851, com uma previsão *PolyPhen* de possivelmente danosa. A maioria das mutações associadas à Síndrome de *Alström* são *nonsense* ou *frameshift* e levam ao encurtamento da proteína. Mutações *missense* são mais raras e o seu impacto clínico ainda não é claro, pois a sequência da proteína é mantida, mas a consequência funcional e o impacto na estrutura tridimensional da proteína da troca dos resíduos de aminoácidos ainda não é conhecida. Neste caso há uma troca entre dois resíduos de aminoácidos apolares, no entanto a prolina tem uma cadeia lateral covalentemente ligada ao grupo α -amina, esta estrutura cíclica confere-lhe uma rigidez característica e a sua substituição pode alterar significativamente a estrutura e funcionamento da proteína (Freire & Quintas, 2008). De facto, devido às características do seu grupo R as prolinas tendem a dobrar a sequência local dos resíduos de aminoácidos e, portanto, dobrar a proteína (Baldwin, 2008). Geralmente encontram-se prolinas nas extremidades das hélices- α ou folhas- β . Numa visão simplificada, a prolina interrompe a estrutura secundária da proteína, impedindo que o esqueleto desta adote uma conformação de hélices- α ou folhas- β (Morgan & Rubenstein, 2013). No presente caso, ao comparar a estrutura tridimensional prevista da proteína mutada com a da proteína canónica verificámos que esta mudança de resíduos de aminoácidos leva a uma ligeira alteração nas posições das hélices- α e folhas- β (Figura 4.14. A-D). Verifica-se também uma perda de elementos de *reverse turns*, que permitem a mudança na direção da cadeia polipeptídica e estão muitas vezes associadas a prolinas devido à sua rigidez (Figura 4.14 A, B). Esta perda implica um arranjo tridimensional diferente, podendo afetar o normal funcionamento da proteína. Tendo em conta que esta mutação foi detetada num indivíduo obeso, podemos especular que esta alteração de resíduos de aminoácidos implica uma alteração estrutural significativa na proteína, com potencial condicionamento da sua função, podendo ser um dos fatores que contribui para o desenvolvimento de obesidade neste indivíduo.

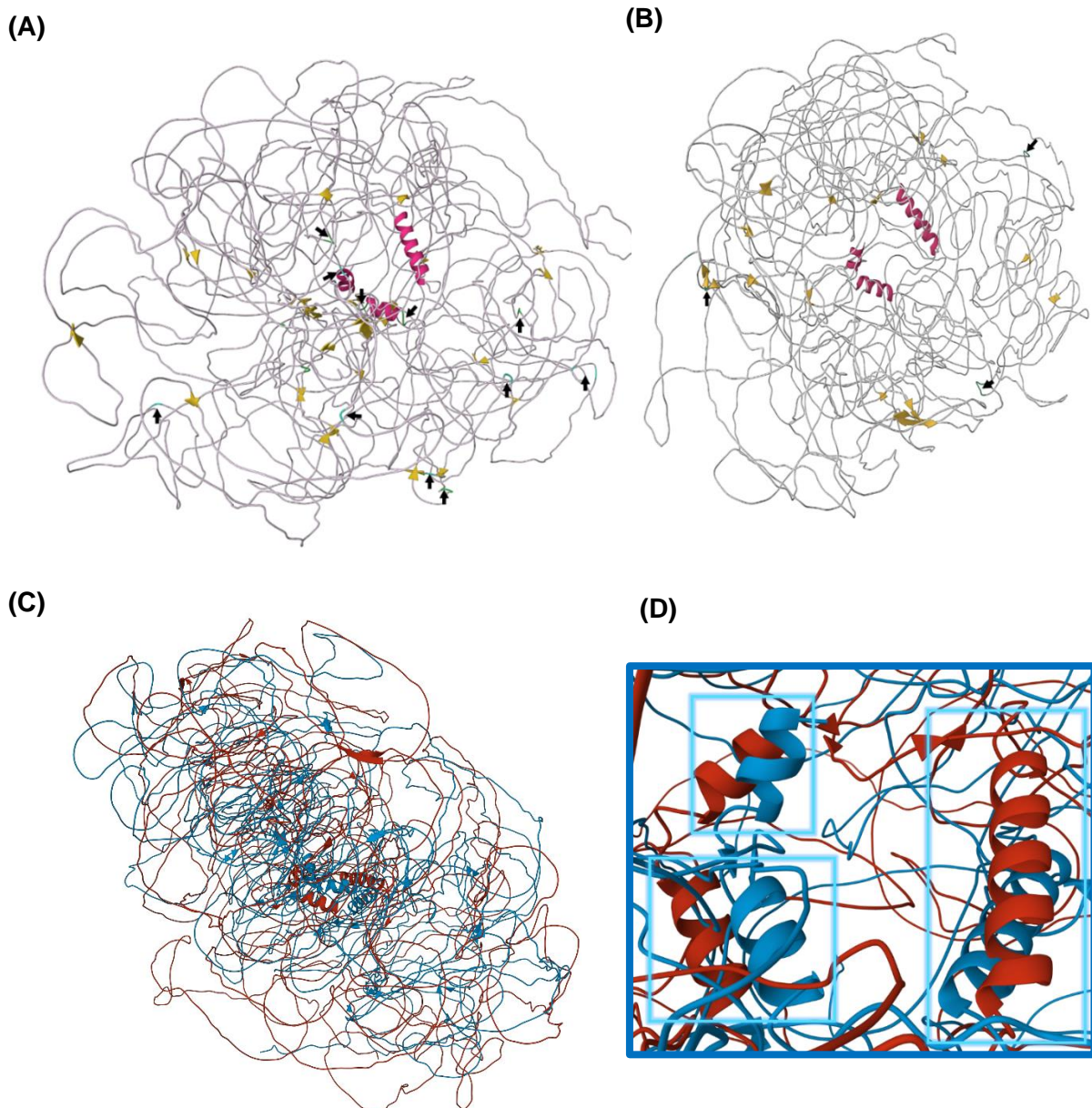


Figura 4.14. Previsão das estruturas tridimensionais dos primeiros 2500 resíduos de aminoácidos da proteína ALMS1.

(A) Proteína canónica. **(B)** Variante c.5552C> T ALMS1. As setas indicam os elementos de reversão, para evidenciar a perda destas estruturas na variante c.5552C> T. **(C)** Sobreposição das duas estruturas proteicas, a azul está representada a estrutura canónica e a vermelho a variante c.5552C> T. **(D)** Detalhe da sobreposição das estruturas e da alteração de posição e ângulos das hélices- α .

4.5. Caracterização de clones transfetados pelo sistema CRISPR/Cas9 para mutação direcionada no gene ALMS1

Em paralelo com a realização das experiências em hTERT-RPE-1 decidimos avaliar os mesmos marcadores em mutantes do gene *ALMS1*. Para obter o mutante pretendido

recorremos ao sistema de CRISPR/Cas9 e posteriormente ao isolamento de clones, como descrito no capítulo 3.6. Ao induzir a mutação estaríamos a expressar constitutivamente a proteína ALMS1 mutada encontrada em doentes obesos e poderíamos avaliar as eventuais disparidades entre células hTERT-RPE-1 exprimindo a proteína ALMS1 mutada e as que não a expressam. Esta análise permitiria ainda entender melhor o papel da proteína ALMS, não só na estrutura do cílio, mas na fisiologia da célula.

Inicialmente foram isolados dois potenciais mutantes baseados nas suas características morfológicas e de crescimento. Ao observar as células no microscópio de contraste de fase invertido verificámos que a morfologia dos clones parecia mais fusiforme e alongada em comparação às células hTERT-RPE-1 não transfetadas, e estas células apresentavam diferentes taxas de crescimento, sendo que o designado clone 1 se assemelhava mais ao comportamento e morfologia das hTERT-RPE-1 (Figura 4.15. A, B), enquanto o clone 2 apresentava muita dificuldade de crescimento, e atipia celular e nuclear, com membranas celulares irregulares e maior tamanho celular (Figura 4.15. C, D). Ao fazermos novo isolamento dos clones, do clone 1 obtivemos 11 subclones, já do clone 2 não foi possível isolar nenhum subclone.

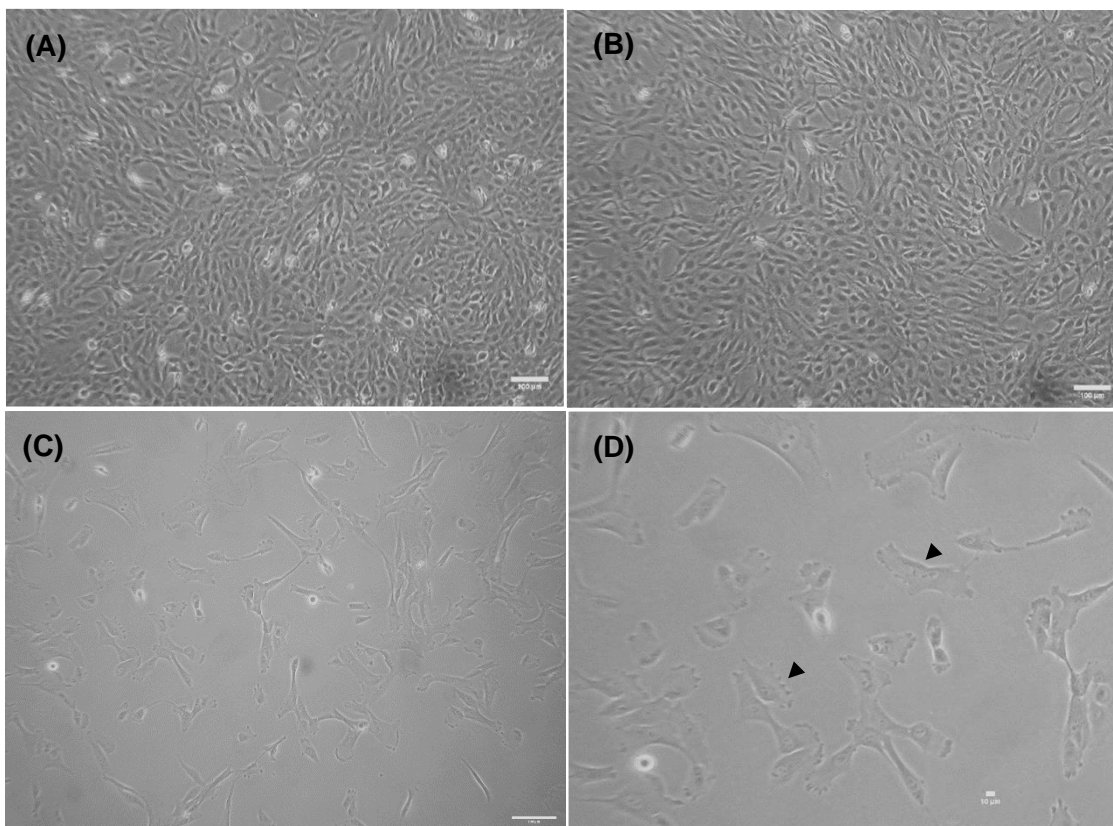


Figura 4.15. Imagens de microscópio de fase invertida representativas de células após 48 horas em cultura.

(A) Células hTERT-RPE-1. **(B)** Clone 1. **(C)** Clone 2. Barra de escala corresponde a 100 μm . **(D)** Detalhe da morfologia atípica do clone 2. Barra de escala corresponde a 10 μm . As setas indicam células com morfologia atípica, nomeadamente irregularidade de membrana celular e tamanho aumentado.

Dos 11 subclones isolados, após extração de DNA genómico um deles não continha material suficiente para realizar amplificação por PCR, os restantes foram amplificados na região do gene *ALMS1*. Deste modo, obtivemos um fragmento com aproximadamente 1180 pb, que foi extraído e sequenciado pelo método de *Sanger*. Todas as sequenciações enviadas foram inconclusivas, após variadas repetições, decidimos desenhar um novo par de *primers* que permitisse a amplificação de um fragmento mais pequeno com aproximadamente 400 pb. Após a obtenção de novos *primers* passámos a fazer uma dupla amplificação, primeiro com os *primers* iniciais e depois com os novos *primers* que amplificavam o fragmento de menores dimensões (Figura 4.16.). Desta vez ao sequenciar as amostras todas elas apresentaram uma mutação no gene *ALMS1*, mas não exatamente a pretendida, em vez da mutação *missense* esperada obtivemos um mutante com uma inserção de um nucleótido de timina na posição 5541 (Figura 4.17.).

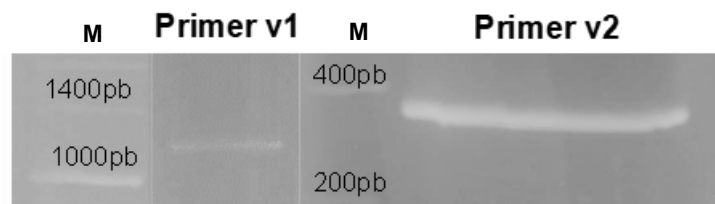


Figura 4.16. Amplificação da região alvo do sistema CRISPR/Cas9 do clone 1 com o *primer v1* e posteriormente com o *primer v2*.

O tamanho esperado do primeiro produto de PCR era aproximadamente 1180 pb. Deste primeiro fragmento foi realizada nova PCR, e o produto desta PCR tinha um tamanho esperado de aproximadamente 400pb. M representa o marcador de massa molecular

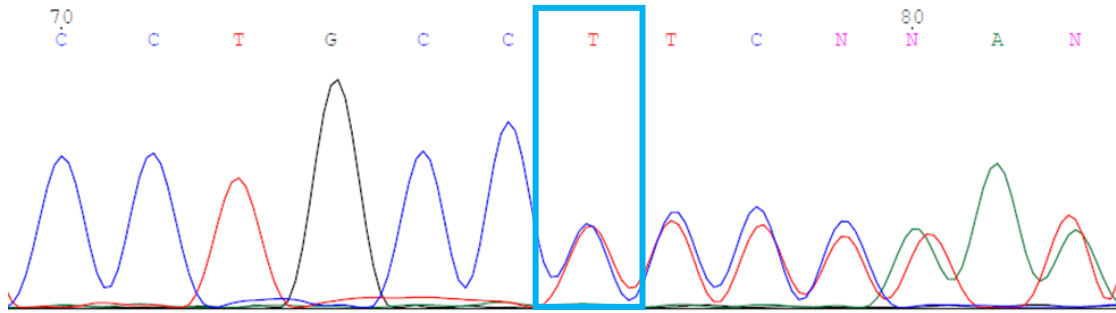


Figura 4.17. Eletroferograma representativo da sequenciação de Sanger. Em destaque a inserção de timina no nucleótido 5541.

4.6. Análise bioinformática da sequência genética do mutante *ALMS1* obtido

Através de análise bioinformática foi possível prever que a variante c.5541_5542insT no gene *ALMS1* origina uma inserção de um nucleótido de timina entre a posição 5541 e 5542, levando a uma alteração na grelha de leitura no exão 8, substituindo uma serina na posição 1848 por uma leucina e levando ao aparecimento de um codão stop prematuro na posição seguinte, com conseqüente encurtamento da proteína (p.Ser1848Leufs*1). Após a sequenciação a análise de sequência nucleotídica obtida indica a presença de um mutante heterozigótico para a mutação.

O aparecimento de um codão stop prematuro levará a um encurtamento da proteína, sendo que o mutante apresenta 1848 resíduos de aminoácidos dos 4169 da proteína canônica. Ao avaliar a estrutura tridimensional é visível a sua alteração devido à perda de resíduos de aminoácidos, e conseqüente perda de elementos de estrutura secundária, nomeadamente hélices- α , algumas das folhas- β e maioria dos *reverse turns* (Figura 4.18. A, B). Todas estas alterações são drásticas e muito provavelmente terão alterações significativas na função da ALMS.

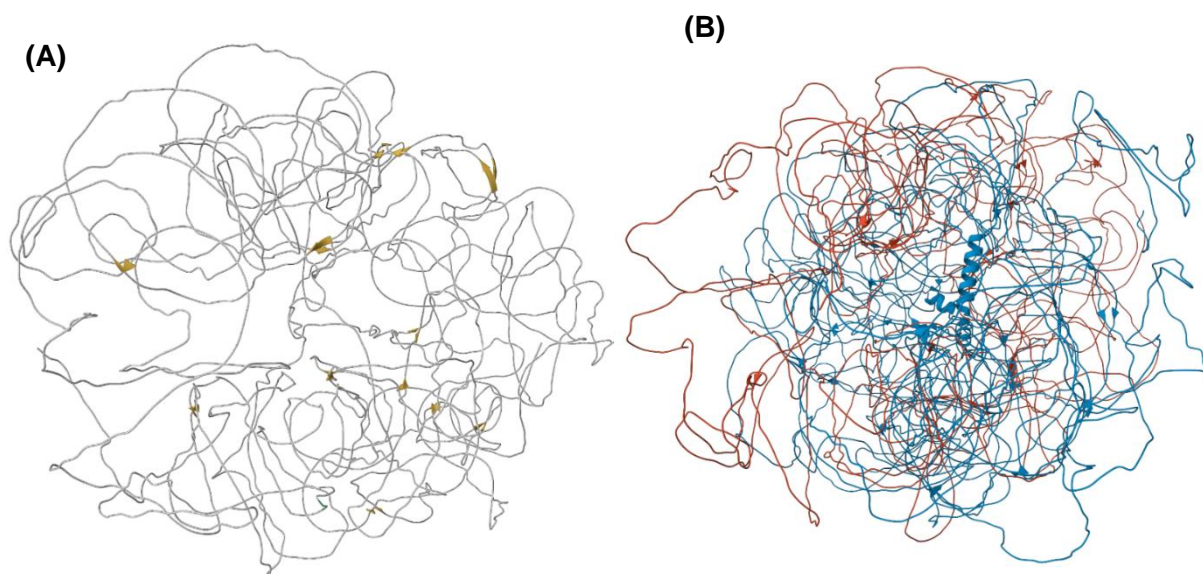


Figura 4.18. Estrutura tridimensional da variante ALMS1 c.5541_5542insT.

(A) Previsão da estrutura tridimensional da variante ALMS1 c.5541_5542insT. **(B)** Sobreposição das duas estruturas proteicas, a azul está representada a estrutura canónica da ALMS1 e a vermelho da variante c.5541_5542insT.

4.7. Caracterização do mutante obtido pelo sistema CRISPR/Cas9

As mutações com alteração na grelha de leitura do exão 8 do *ALMS1* são as mais comuns em doentes com Síndrome de *Alström*. Sendo que estes clones expressam uma proteína ALMS1 mais curta, mas também proteína ALMS1 canónica, uma vez que são heterozigóticos, e tendo em conta as funções descritas para a proteína ALMS fomos investigar se a linha celular mutada era capaz de montar cílios primários quando privada de soro. Ao observar as células no microscópio de contraste de fase invertido verificámos que, como visto anteriormente, a morfologia dos clones parecia mais fusiforme e alongada (Figura 4.19. B) em comparação às células hTERT-RPE-1, mas desta vez ao ciliar as células as diferenças entre o mutante e as hTERT-RPE-1 são mais acentuadas, possivelmente porque temos menor densidade celular o que facilita a avaliação das diferenças morfológicas.

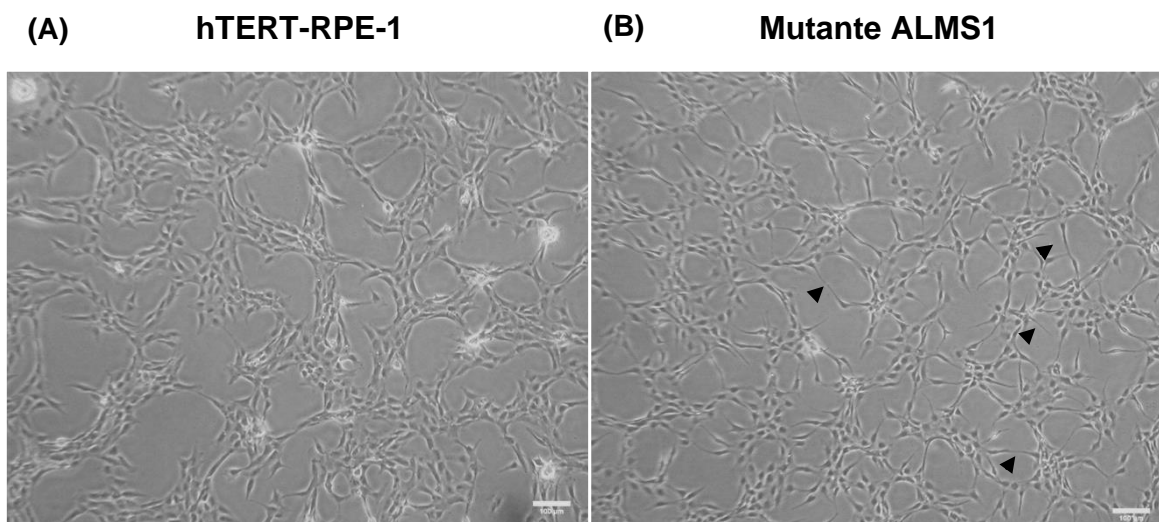


Figura 4.19. Imagens de microscópio de fase invertida representativas de células 24 horas após privação de soro.

(A) Células hTERT RPE-1. **(B)** Mutante ALMS1 c.5541_5542insT. As setas indicam as células mais fusiformes alongadas nos mutantes A barra de escala corresponde a 100 μ m.

Posteriormente, marcamos as células com anti- α -tubulina-acetilada que marca os microtúbulos do axonema ciliar para avaliar a presença de cílios e com anti-pericentrina, que é um marcador de centrossomas e corpo basal, visto a ALMS1 estar associada a estas duas estruturas celulares. Ao observar as preparações no microscópio de imunofluorescência verificamos que os mutantes ALMS1 não apresentavam acetilação, nem nos microtúbulos nem nos cílios, não sendo possível discernir nenhuma das estruturas. Quanto aos centríolos, apresentavam marcação aparentemente normal, mas carece de mais experiências para confirmar o resultado (Figura 4.20. A).

Tendo em conta que não foi possível observar nenhuma estrutura ao marcar as células com anti- α -tubulina-acetilada, decidimos observar a marcação de α -tubulina, para perceber se as células tinham um problema em acetilar os microtúbulos ou outro problema no desenvolvimento do citoesqueleto. Nas células marcadas com α -tubulina, foi possível observar o aster de microtúbulos o que indica que o problema será na acetilação destes polímeros. No entanto a organização do citoesqueleto de microtúbulos, em comparação às hTERT-RPE-1 controlo, parece estar alterado, formando feixes de α -tubulina mais acentuados (Figura 4.20. B). A ausência de acetilação dos microtúbulos pode estar associada a uma possível instabilidade de microtúbulos e cílios podendo alterar a função dos mesmos (Eshun-Wilson et al., 2019; Janke & Montagnac, 2017; Yan et al., 2018). No entanto, estes ainda são resultados preliminares, sendo fundamental a repetição dos ensaios para continuarmos a caracterização do mutante obtido.

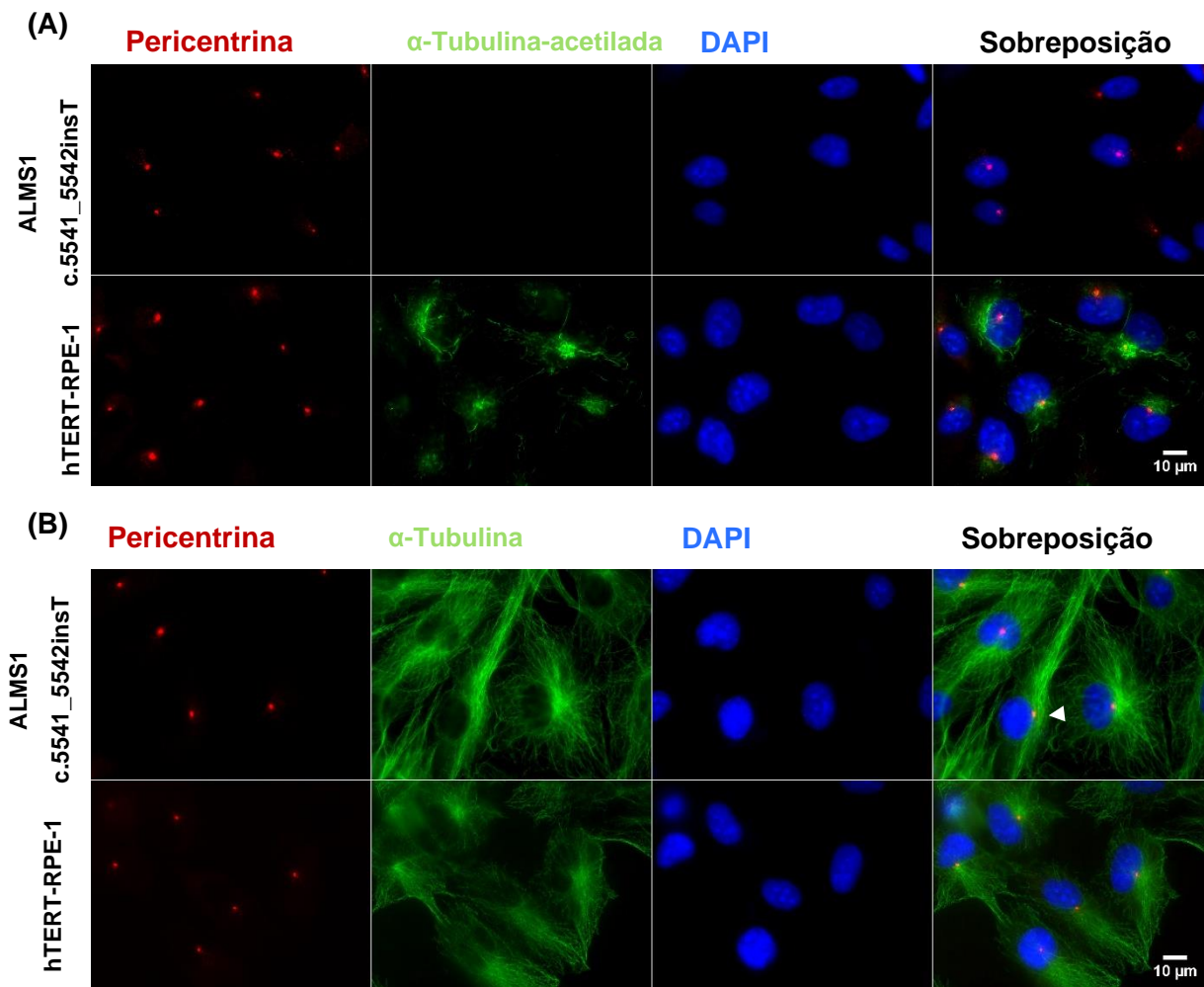


Figura 4.20. Microscopia de imunofluorescência na variante ALMS1 c.5541_5542insT e em hTERT-RPE-1.

(A) Imagens representativas da marcação de α -tubulina-acetilada e pericentrina, 24 horas após remoção do soro. **(B)** Imagens representativas da marcação de α -tubulina e pericentrina, 24 horas após remoção do soro. O DNA foi marcado com DAPI. A seta indica os feixes de α -tubulina mais acentuados.

5. Discussão

O cílio primário é um pequeno organelo celular que tem vindo a ganhar relevância por ter um papel central nos processos sensoriais e de sinalização celulares, desempenhando um enorme papel na regulação da proliferação, polaridade, diferenciação e manutenção de tecidos e com forte relação ao controlo do metabolismo celular, nomeadamente da glucose (Anvarian et al., 2019; Hildebrandt et al., 2011; Song et al., 2018).

A disfunção do cílio primário está associada ao desenvolvimento de ciliopatias, tais como a Síndrome de *Alström*, doença monogénica associada ao desenvolvimento de obesidade infantil, diabetes *mellitus* tipo 2, distrofia da retina e alterações neurossensoriais. Estes fenótipos estão associados a mutações no gene *ALMS1* com consequentes alterações na respetiva proteína, a qual se localiza normalmente no corpo basal e no centrossoma (Castro-sánchez et al., 2015; Girard & Petrovsky, 2011). As células que apresentam estas disfunções ciliares podem funcionar como modelos importantes para investigar a relevância do cílio primário no controlo do metabolismo celular, e como a sua alteração funcional, e consequentemente das vias de sinalização relacionadas, levam ao desenvolvimento de fenótipos metabólicos (Hildebrandt et al., 2011; Tobin & Beales, 2009).

Visto que um dos fenótipos característico na Síndrome de *Alström* e em diversas outras ciliopatias é a distrofia da retina, a disfunção do cílio primário na retina parece ser fundamental para o desenvolvimento desta distrofia (Chen et al., 2021). A glucose é a maior fonte de energia da retina, um tecido metabolicamente muito ativo e as células do epitélio pigmentado da retina, usadas como modelo biológico neste trabalho, estão envolvidas na fagocitose do segmento externo do fotorreceptor e reciclagem de componentes do ciclo visual, mas também no controlo do transporte de nutrientes, tais como a glucose, ácidos gordos, retinol, e também de água e iões (Strauss, 2005). A presença de um cílio primário é necessária para a maturação completa destas células e consequentemente para a sua função, desta forma disfunções do cílio primário levam à degeneração de células do epitélio pigmentado da retina, que precede a degeneração dos fotorreceptores, contribuindo para o desenvolvimento de distrofia retiniana (May-Simera et al., 2018; Sun et al., 2021). Neste contexto, foi objetivo do presente trabalho estudar o papel dos cílios na resposta a níveis elevados de glucose em hTERT-RPE-1.

Como já referido, uma das vias de sinalização associadas ao cílio é a via Hippo, sabendo-se que o complexo YAP/TAZ, efetor desta via, e o cílio se regulam reciprocamente. Esta via de sinalização é responsável pelo controlo da proliferação e

tamanho celular, embriogênese, diferenciação, sobrevivência e reparação e é regulada por vários estímulos biomecânicos e bioquímicos (Ibar & Irvine, 2020; Wheway et al., 2018). Em células tumorais e embrionárias, foi descrita uma relação entre a atividade do complexo YAP/TAZ e a disponibilidade de glucose no meio. Em elevadas concentrações de glucose parece haver menor fosforilação do YAP e uma hiperativação nuclear do mesmo, que por sua vez, leva à transcrição de fatores de manutenção da glicólise aeróbia e proliferação continuada, características de células tumorais. Por outro lado, em meios sem glucose, com inibição da glicólise ou maior fosforilação oxidativa observa-se a retenção citoplasmática do YAP (Enzo et al., 2015; Santinon et al., 2016; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2017). No entanto, nos vários estudos que caracterizam a via Hippo e o seu efetor YAP/TAZ, as suas variações em função de diferentes níveis de glucose têm sido descritas maioritariamente em células tumorais ou embrionárias.

Sabendo que as células hTERT-RPE-1 no seu contexto fisiológico se encontram sujeitas a elevados níveis de glucose e a uma elevada taxa metabólica, e que a presença do cílio primário é fundamental para a sua normal função, decidimos caracterizar a resposta destas células a diferentes concentrações de glucose na presença ou na ausência de cílios primários estudando para isso o impacto nos níveis de YAP celular.

Ao suplementarmos as células hTERT-RPE-1 com diferentes concentrações de glucose obtivemos comportamentos distintos. Quando foram adicionadas menores concentrações de glucose (5 mM) as células aumentaram os níveis de YAP na célula. Por outro lado, quando sujeitas a elevadas concentrações de glucose (25 mM) os níveis de YAP celular diminuíram significativamente. Ao contrário do descrito na literatura em experiências com células tumorais (Enzo et al., 2015; Santinon et al., 2016; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2017), não observamos uma variação da translocação de YAP entre o núcleo e o citoplasma, mas apenas uma variação global dos níveis de proteína, indicando que estas variações se possam dever a uma alteração na taxa de síntese ou de degradação da proteína.

Uma elevada expressão de YAP celular foi também observada em adipócitos provenientes de humanos e de ratinho que apresentavam resistência à insulina (Han et al., 2022). Nestes cenários, observa-se que a via de sinalização de insulina fica comprometida e as células não são capazes de desenvolver uma resposta adequada à hiperglicémia (Samuel & Shulman, 2012). Paralelamente, a hiperativação de YAP nos adipócitos contribui para a um ambiente pró-inflamatório, com aumento da fibrose e da formação de tecido adiposo perigonadal (Han et al., 2022). Deste modo parece que o YAP desempenha um papel na resposta à presença de glucose no meio, e a presença

constante de níveis elevados de glucose poderá contribuir para a constante ativação de YAP no núcleo, o que leva ao agravamento da situação. No entanto, em células hTERT-RPE-1 em condições fisiológicas, que não têm um comprometimento metabólico grave como as referidas anteriormente, é expectável que estas sejam capazes de reagir ao meio envolvente e manter a homeostasia celular, e, como tal, quando sujeitas a concentrações patológicas de glucose, observa-se um decréscimo dos níveis de YAP, talvez como um mecanismo de defesa celular. Os autores anteriormente referidos relatam ainda que o *knockout* do gene YAP nos adipócitos leva, de facto, a um aumento da tolerância à glucose, diminuição da acumulação de tecido adiposo perigonadal, da inflamação e da fibrose. Deste modo, é plausível que uma célula em condições fisiológicas tenha capacidade de regular a sua expressão de YAP, por forma a contrariar os efeitos dos elevados níveis de glucose e manter a homeostasia celular. Outro estudo, realizado em células musculares com *knockout* do gene TAZ demonstra o efeito oposto, apresentando menor tolerância à glucose e sensibilidade à insulina (Hwang et al., 2019). A discrepância observada nos resultados poderá ser causada pelo facto dos estudos estarem a avaliar diferentes linhas celulares, ainda que sejam ambas de tecidos metabolicamente ativos. Alternativamente, poderá dever-se ao facto de ter sido avaliada apenas a proteína TAZ, apesar do YAP/TAZ agirem como um complexo e serem ambos efetores da via Hippo, cada um apresenta funções únicas, podendo eventualmente, encaminhar a resposta celular de forma diferente (Misra & Irvine, 2018; Varelas, 2014).

Um estudo feito em RPE-1 demonstrou que as células apresentam um marcado decréscimo da síntese proteica global após exposição a meios com 19,5 mM de glucose ou maiores concentrações após 24 horas (Dircks et al., 1987). Este efeito, provavelmente uma resposta ao stress provocado por elevadas concentrações de glucose, poderá explicar a diminuição dos níveis YAP celular quando as hTERT-RPE-1 foram expostas a 25 mM de glucose. Mais recentemente, Farnoodian et al. (2016) mostraram que quando as RPE-1 são expostas a elevadas concentrações de glucose (40,7 mM) apresentam um aumento de diversas proteínas, nomeadamente algumas integrinas, componentes da matriz extracelular, fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF) e um aumento nuclear de *Zonula occludens-1* (ZO-1), proteína presente nas junções de oclusão, refutando a ideia de que o excesso de glucose conduz a uma diminuição generalizada dos níveis de todas as proteínas. Estes autores observaram uma diminuição específica da expressão de β -catenina, efetor da via *Wnt*, via de sinalização associada ao cílio, e que mais recentemente foi também associada ao complexo YAP/TAZ. Estas duas vias são fundamentais para o crescimento de órgãos, desenvolvimento embrionário e para a organização de tecidos, existindo evidências que

indicam que estas vias cooperam, na translocação simultânea de YAP/TAZ e de β -catenina para o núcleo. Este transporte ocorre através da associação do YAP/TAZ ao complexo de degradação da β -catenina. Deste modo, a ativação da via Hippo que leva à retenção citoplasmática de YAP, leva também à retenção da β -catenina no citoplasma, sendo em seguida eventualmente degradados. Por outro lado, quando há translocação de YAP/TAZ para o núcleo, é desativado o complexo de degradação de β -catenina e aumenta sua localização nuclear (Azzolin et al., 2014; Song et al., 2018). O facto de termos observado um decréscimo na expressão de YAP em células exposta a elevadas concentrações de glucose, vai de encontro ao descrito com a diminuição de expressão de β -catenina, indicando que em resposta a elevadas concentrações de glucose as hTERT-RPE-1 poderão inibir a transcrição de genes de proliferação, regeneração e diferenciação.

Para entendermos o papel dos cílios nesta resposta, decidimos induzir a formação antes e depois da suplementação das células com glucose (Figura 4.2. B, Figura 4.5.). Estas experiências mostraram que quando o cílio primário está presente antes da suplementação com a glucose impede o aumento da expressão celular de YAP quando adicionados 5mM de glucose e acentua a diminuição dos seus níveis quando adicionados 25 mM, parecendo acentuar os efeitos celulares de resposta à glucose. Como referido anteriormente, o cílio e o complexo YAP/TAZ regulam-se mutuamente, sendo possível que a ativação do complexo MST1/2-SAV1 da via Hippo leve a uma maior retenção citoplasmática de YAP e à sua degradação aquando da formação do cílio primário, levando eventualmente a uma diminuição geral dos níveis de YAP na célula. É então interessante relacionar o aumento de YAP que foi observado em doentes com resistência à insulina, descrito por Han et al. (2022) à regulação negativa da via devido à presença dos cílios primários. Sugere-se assim que em doentes com hiperglicémia crónica, possa haver uma hiperativação de YAP no núcleo, que contribui para a desmontagem do cílio através do aumento da expressão de AURKA e PLK1 (Rausch & Hansen, 2020). De acordo com o que foi observado nas hTERT-RPE-1 estas células terão mais dificuldades em realizar todas as funções de sinalização associadas ao cílio, o que dificultará a capacidade de estas manterem a sua homeostasia e de atenuarem os efeitos celulares causados pela glucose.

Nas experiências em que os cílios são induzidos após a exposição à glucose, parece haver um efeito oposto ao observado quando estes já se encontram presentes (Figura 4.3 e Figura 4.5.). Estas observações poderão estar relacionadas com o tempo em que as células foram mantidas em cultura após a suplementação com a glucose. Deste modo, para garantirmos se o efeito é causado pelo tempo de exposição à glucose ou

pela presença de cílio após a exposição teremos de repetir a experiência com um novo controlo, onde a exposição à glucose seja feita simultaneamente, e as células sejam mantidas o mesmo tempo em cultura. Para melhorar interpretação os resultados obtidos sobre o impacto do cílio na regulação dos níveis de YAP em resposta a diferentes níveis de glucose seria importante repetir o ensaio com as células apresentando uma maior percentagem de cílios. Mais ainda, para perceber melhor as variações observadas nos diferentes compartimentos celulares (núcleo vs citoplasma) poderemos fazer um *Western Blot* onde seriam analisados extratos proteicos resultantes de um fracionamento celular de modo a confirmar, se por este método a inexistência de translocação do YAP entre núcleo vs citoplasma é confirmada.

A via Hippo é considerada uma via supressora tumoral, que quando inativada promove a translocação de YAP para o núcleo, e ativa a transcrição de genes-alvo anti-apoptóticos, de divisão celular e de diminuição a senescência celular (Jia et al., 2018; Kim et al., 2018; Totaro et al., 2018). Deste modo, a hiperativação desta via está associada ao desenvolvimento da tumorigénese. Como já referido, condições elevadas de glucose estão associadas a uma maior ativação de YAP e dos seus genes alvo (Ibar & Irvine, 2020). Por outro lado, estas também já foram associadas à indução da apoptose e comprometimento da permeabilidade da membrana celular (Lim et al., 2012; Villarroel et al., 2009). Estudos mais recentes em hTERT-RPE-1 apontam também para um aumento da capacidade de migração das células expostas a elevados níveis de glucose, mas sem alterações relevantes na proliferação e apoptose (Farnoodian et al., 2016). Face a estes dados, decidimos então confirmar, através de citometria de fluxo, se o efeito das alterações na expressão dos níveis de YAP observados em hTERT-RPE-1 tinham algum impacto no ciclo celular. Esta análise informou-nos que em células hTERT-RPE-1 sujeitas a glucose, independentemente da concentração e quer a suplementação ocorra às 24 ou às 48 horas, o número de células em fase S e G2 aumentou ligeiramente, parecendo haver uma tendência para progredirem no ciclo celular. Esta observação é mais clara quando as células são sujeitas a menores concentrações de glucose às 48 horas, onde se verificou também um aumento dos níveis de YAP celular e nos seus compartimentos nuclear e citoplasmático o que, está de acordo com o descrito na literatura (Wang et al., 2015), mas mais uma vez, os nossos resultados revelam um aumento em todos os compartimentos celulares, e não só apenas no núcleo, por isso a relação entre as diferentes variáveis deverá ser confirmada em novos ensaios.

Na presença de cílio primário antes da suplementação com a glucose, observámos uma tendência semelhante, que parece levar a ligeira progressão no ciclo celular, com

exceção das células submetidas a elevadas concentrações de glucose. Neste último caso, o número de células em G1 aumenta, diminuindo as células em fase S, e aumentando ligeiramente em G2, parecendo que, este excesso de glucose, poderá induzir um bloqueio no ciclo celular. Estes resultados conjuntamente com os resultados obtidos em relação aos níveis de YAP, mostram que o cílio parece ter um papel na resposta da célula aos níveis de glucose, nomeadamente diminuindo significativamente a expressão de YAP na célula, e contribuindo para um potencial atraso/bloqueio no ciclo celular. Estas observações estão de acordo, com a observação de que menor quantidade de YAP na célula e, eventualmente, no núcleo, levará à menor expressão de genes de proliferação. Mais uma vez, a presença dos cílios após a suplementação com glucose não parece ter grande impacto no ciclo celular.

Ao contrário do que foi descrito anteriormente em astrócitos, em que a privação de glucose levava a um aumento de volume celular (Lee et al., 2016), no nosso estudo a presença de maiores níveis de glucose parece aumentar o tamanho e granularidade celular, aumento este que é observável com apenas 24 horas de exposição à glucose (Figura 4.8. e Figura 4.9.). Por outro lado, num estudo realizado em podócitos, foi descrito que elevados níveis de glucose não pareciam alterar o tamanho celular após 48 horas em cultura. Porém, ao fim de dez passagens das células com meio suplementado com elevados níveis de glucose, estas apresentavam um aumento significativo de tamanho e do seu conteúdo mitocondrial, demonstrando assim, adaptações metabólicas (Stieger et al., 2012). Podemos assumir que o aumento do tamanho e granularidade celular em hTERT-RPE-1 seja um processo mais rápido, em provável relação com o facto de ser um tecido metabolicamente muito ativo, e consequentemente a resposta à glucose poder ser desencadeada em menos tempo. É possível que o aumento da granularidade seja devido ao aumento de conteúdo mitocondrial como observado por Stieger *et al.* (2012), mas pode ser também devida ao aumento de tráfego de vesículas característico de elevada atividade metabólica.

A presença de cílio, principalmente antes da suplementação parece ser fundamental no controlo do tamanho e granularidade celular, parecendo mais uma vez, atuar como um modelador da resposta celular, contribuindo para a diminuição tanto do tamanho como da granularidade quando expostos a diferentes concentrações de glucose. Em células do epitélio renal sujeitas a um fluxo de fluídos, está descrita uma relação entre a deteção do fluxo pelo cílio primário e a indução de autofagia (Orhon et al., 2016), que por sua vez, é responsável pela diminuição do tamanho e volume celular. Ainda que as células que observámos em cultura não estejam sujeitas às mesmas forças mecânicas parece que o cílio atua de uma forma semelhante em resposta à glucose, levando à redução

do seu volume e granularidade. O papel do cílio revela-se mais evidente nas células expostas a manitol, que induz uma maior força osmótica, reiterando o papel do cílio no controlo de stress osmótico das células, como já tinha sido descrito anteriormente (Masyuk et al., 2006; Shiba et al., 2005; Siroky et al., 2017).

A variante de histona γ -H2AX é um marcador de danos na dupla cadeia de DNA, pois é fosforilada no resíduo Serina-139 da região C-terminal em resposta a estes danos (Sharma et al., 2012). Existem várias evidências na literatura de que as células expostas a elevados níveis de glucose apresentam um aumento de *foci* de γ -H2AX, associados a uma maior produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Beckman & Ames, 1997; Salmon et al., 2004). Nestas condições as células apresentam taxas de reparação de danos de DNA mais lentas, acumulando mais mutações e *foci* de γ -H2AX. Células em fase S, G2 e mitose também apresentam maiores níveis de γ -H2AX (Tanaka et al., 2006; Zhong et al., 2018). A presença de *foci* de γ -H2AX também é utilizada como marcador de senescência celular, mesmo quando as células não apresentem danos no DNA (Pospelova et al., 2009). No entanto, a senescência também pode ser uma resposta a danos de DNA, stress oxidativo e encurtamento de telómeros, impedido a divisão de células danificadas (Muñoz-Espín et al., 2013). É possível a existência de um efeito cumulativo dos danos no DNA e da senescência na expressão de γ -H2AX.

A diferenciação entre células senescentes e a reparação de danos no DNA poderá ser feita através da avaliação de outras características de senescência, como o bloqueio do ciclo celular em G1, tamanho aumentado e maior granularidade da célula, pois apresentam um fenótipo secretor associado ao estado senescente e um aumento da atividade lisossomal (González-Gualda et al., 2021; Sherwood et al., 1988).

A marcação de γ -H2AX é geralmente classificada pelos *foci*, mas pode haver expressão pan-nuclear, que expressa γ -H2AX em todo o núcleo, estando geralmente associada a situações de stress replicativo letal e apoptose (Moeglin et al., 2019), neste trabalho quantificámos os níveis totais de γ -H2AX no núcleo, que englobam os *foci* e a marcação pan-nuclear. Esta marcação geralmente não está associada nem a senescência, nem a reparação de danos na dupla cadeia de DNA, mas pode refletir um estado aumentado de stress celular.

Os nossos resultados mostram que as células expostas a 5mM de glucose às 48 horas aumentam a intensidade de *foci* e total de γ -H2AX, conjuntamente com um ligeiro aumento de células em fase S, do tamanho e da granularidade celular, indicando que nestas concentrações é possível que o aumento de γ -H2AX esteja associado a um maior stress celular e a uma maior reparação de danos da dupla cadeia de DNA e não

tanto a senescência celular, visto não parecer haver bloqueio do ciclo e as alterações morfológicas serem ligeiras. Por outro lado, em elevadas concentrações de glucose observa-se uma diminuição significativa da intensidade de γ -H2AX, tanto dos *foci* como total, no entanto esta diminuição ocorre em células com um tamanho e granularidade significativamente maiores, e a percentagem de células em S e G2 não aumenta praticamente em comparação às que não foram suplementadas. As células expostas a elevadas concentrações de glucose também apresentavam menor expressão de YAP, que está associada à indução de senescência. Deste modo, as células apresentam características típicas de senescência celular, mas a baixa intensidade de γ -H2AX indica o contrário. No entanto, evidências recentes indicam que o tamanho aumentado nas células pode contribuir para um efeito diluição citoplasmática de proteínas e RNA, condicionando diversas funções celulares, nomeadamente o ciclo celular (Neurohr et al., 2019). Neste caso, as concentrações elevadas de glucose, podem então estar a induzir o início da senescência celular, que poderá só ser visível na expressão de γ -H2AX caso as células sejam mantidas mais tempo em cultura. De facto, observámos que quando a glucose foi adicionada às 24 horas e foi mantida mais 48 horas em cultura, independentemente da concentração de glucose houve um aumento da intensidade dos *foci* de γ -H2AX, sendo maior o aumento em elevadas concentrações. Nestas condições observa-se um aumento significativo do tamanho e granularidade celular quando adicionada glucose, mas também um ligeiro aumento das células em fase S, ainda que não seja significativo, indicando a γ -H2AX como possível marcador de senescência nestas células. A marcação total no núcleo só parece estar aumentada em concentrações elevadas de glucose o que pode indicar que níveis elevados de glucose e um maior tempo de cultura após a suplementação podem originar maior stress celular e eventualmente mais danos na dupla cadeia de DNA. Neste caso, propomos a hipótese de um efeito cumulativo de senescência e danos no DNA em elevadas concentrações de glucose.

O cílio primário tem vindo a ser associado à resposta de dano de DNA (DDR) (Johnson & Collis, 2016; Morrison, 2021), que mantém a estabilidade genómica através da deteção de danos no DNA ou erros de replicação, direcionando a maquinaria celular para a sua reparação, evitando o desenvolvimento de patologias, como o cancro. Tanto o cílio primário como a DDR necessitam de sinais celulares específicos e são coordenados com o ciclo celular (Chen et al., 2021; Maréchal & Zou, 2013). A desmontagem do cílio primário ocorre tipicamente antes da célula entrar em mitose, ocorrendo em simultâneo com os *checkpoints* de replicação de DNA e de separação dos cromossomas, postulando-se que a desregulação da ciliogénese possa levar à falha

nestes *checkpoints*. Proteínas como a Cep131 (Staples et al., 2012), Cep290 (Slaats et al., 2015), Cep164 (Chaki et al., 2012; Sivasubramaniam et al., 2008) e Ccdc13 (Staples et al., 2014), que estão associadas ao centróssoma e conseqüentemente à ciliogénese, estão envolvidas na DDR. A cinase ATR (Valdés-Sánchez et al., 2013), fundamental na DDR, localiza-se no cílio conector do fotoreceptor e ratinhos com déficit de ATR exibem disfunção ciliar e degeneração do fotoreceptor. Desta forma, pensa-se que as vias de sinalização associadas ao cílio, como a Hippo, mTor, TGF β e Notch possam modular a DDR (Vermezovic et al., 2015). O cílio primário também já foi relacionado com a senescência estando descrito que em fibroblastos senescentes os cílios são maiores e há uma menor sinalização da via *Hh* (Breslin et al., 2014). Por outro lado, em células mesenquimais estaminais foi descrita uma regulação negativa da via *Hh* que leva à supressão da senescência celular (Fu et al., 2021). Estas discrepâncias podem dever-se ao facto de serem linhas celulares diferentes, que apresentam diferentes padrões de expressão de genes, bem como sinalização ciliar e frequência de montagem de cílios distintas. No entanto, parece haver uma relação entre o cílio, a sinalização *Hedgehog* e a regulação de senescência celular.

Os nossos resultados mostram que a presença de cílio antes ou depois da suplementação de glucose parece equiparar a intensidade dos *foci* de γ -H2AX às células onde não houve adição de glucose, sugerindo que o cílio poderá controlar de alguma forma os níveis de senescência ou de danos no DNA causados pela presença de elevados níveis de glucose no meio.

A presença de cílio antes da suplementação reduz os níveis de γ -H2AX causados pela glucose em baixas concentrações, indicando que a presença deste organelo possa reduzir eventuais danos/senescência causados pela glucose. Quando o cílio é formado após a suplementação, os níveis de γ -H2AX tendem a diminuir, com exceção de quando expostos a baixas concentrações de glucose, onde verificamos um aumento da γ -H2AX aquando da formação do cílio. Parece uma capacidade do cílio regular a expressão de γ -H2AX quando sujeito a diferentes concentrações de glucose, mas esta relação ainda carece de esclarecimento.

Um dos objetivos do presente estudo era avaliar como variantes da ALMS1 influenciam a montagem e função dos cílios, de forma a investigar a relevância do cílio primário no controlo do metabolismo celular. Recentemente, Ginete e colaboradores (2021) identificaram 94 variantes em genes relacionados com a biogénese e função dos cílios (ALMS1, família BBS, CCDC28B e TMEM67) numa população portuguesa de 72 indivíduos obesos. Destas 94 variantes encontradas quatro ainda não haviam sido

encontradas ou descritas em populações humanas (Ginete et al., 2021). Uma destas mutações foi detetada no gene *ALMS1*, como sendo uma mutação *missense ALMS1* (c.5552C>T), com o potencial de afetar a função da proteína codificada por este gene, ainda que nenhum dos pacientes portadores tenham sido diagnosticados com ciliopatia. Para averiguar o impacto funcional desta variante, utilizámos o sistema CRISPR-Cas9 com reparação por homologia direta para edição do genoma de forma a expressar constitutivamente em hTERT-RPE-1 as proteínas mutadas identificadas. O objetivo seria o de caracterizar a forma *ALMS1* mutante especialmente a nível da capacidade de montarem cílios primários e eventualmente investigar qual a resposta celular dos mutantes quando expostos às mesmas condições de indução de cílios e concentrações de glucose que hTERT-RPE-1 saudáveis.

No entanto, após sequenciação dos clones obtidos não se identificou a mutação esperada, mas sim uma mutação diferente (c.5541_5542insT). Esta alteração consistia numa inserção de um nucleótido de timina entre a posição 5541 e 5542 do gene *ALMS1* tendo sido criada uma linha celular mutante heterozigótica. A referida mutação leva a uma alteração na grelha de leitura e ao aparecimento de um codão stop prematuro na posição seguinte, com consequente encurtamento da proteína (p.Ser1848Leufs*1).

Ainda que não tenha sido a variante expectável e a linha celular obtida ser heterozigótica, decidimos caracterizar este mutante, pois apresenta uma mutação no exão 8 e uma alteração na grelha de leitura, que é um tipo de mutação comum em doentes com Síndrome de *Alström*. Deste modo, a linha celular criada poderia constituir um bom modelo celular para estudar o papel do cílio na resposta à glucose quando este está à partida disfuncional.

Diversos contratempos experimentais, como o facto das sequenciações inicialmente serem inconclusivas, e a necessidade de desenhar novos *primers*, fizeram com que o tempo para o estudo do mutante obtido fosse reduzido. Assim, os resultados obtidos são preliminares, sendo necessário continuar num futuro próximo a caracterização do mutante obtido. É também nossa intenção tentar realizar uma nova transfecção de hTERT-RPE-1 para obter uma linha celular contendo a mutação direcionada c.5552C>T *ALMS1*, pois esta foi identificada num indivíduo obeso, e seria importante identificar as eventuais diferenças entre as células hTERT-RPE-1 normais, as células hTERT-RPE-1 expressando a mutação c.5541_5542insT que origina perda de grande parte da proteína, e as células hTERT-RPE-1 expressando a mutação *missense* c.5552C>T. Esta última mutação apesar de não originar uma proteína *ALMS1* truncada poderá afetar a função da proteína. De facto, segundo a nossa análise bioinformática, esta mutação

parece alterar ligeiramente as posições das hélices- α e folhas- β da ALMS1 e a perda da maioria dos *reverse turns*. Este estudo conjugado das três linhas celulares será bastante útil para tentar perceber se existe um eventual “gradiente” de impacto na função da proteína ALMS1 e conseqüentemente nos fenótipos associados. Este estudo seria bastante importante para esclarecer o impacto do cílio noutras formas de obesidade que não as consideradas ciliopatias clássicas.

Os resultados preliminares no mutante c.5541_5542insT *ALMS1* revelam que a sua capacidade de acetilar microtúbulos parece estar comprometida, não sendo possível visualizar nem cílios nem microtúbulos acetilados. No entanto ao averiguar a marcação de α -tubulina observámos que o citoesqueleto de microtúbulos da célula era normal apesar de apresentar alguns feixes de microtúbulos em comparação as redes de microtúbulos observados nas células hTERT-RPE-1 que não apresentavam a mutação. O papel de ALMS1 na acetilação é desconhecido. Sabe-se que esta proteína se localiza no corpo basal, onde várias proteínas interagem e contribuem para a manutenção e estabilidade do cílio, nomeadamente o complexo MST1/2-SAV1. Pensa-se que este complexo interage com proteínas como a NPHP, sendo esta interação fundamental no controlo da carga que entra no cílio e no favorecimento da ciliogénese. A MST1/2 no corpo basal interage e catalisa a fosforilação a AURKA, potenciando a ciliogénese através da inibição da interação de AURKA com a HDAC6. Esta interação leva à formação de um complexo envolvido na desmontagem do cílio (M. Kim et al., 2014; Wheway et al., 2018). Podemos especular que pela proximidade a ALMS1 mutada possa perder domínios de interação com a MST1/2 que por sua vez, pode condicionar a sua função normal e a estabilidade e eventual acetilação do cílio. Para esclarecer esta hipotética interação entre ALMS1 e MST1/2, mais estudos teriam de ser realizados, como por exemplo, ensaios de co-immunoprecipitação. Seria também interessante avaliar a atividade da HDAC6.

A acetilação dos microtúbulos do axonema parece ser importante para a sua estabilização e para lhes conferir flexibilidade e resiliência mecânica, fundamental para processos de mecanotransdução (Eshun-Wilson et al., 2019; Janke & Montagnac, 2017; Yan et al., 2018). Defeitos na acetilação dos cílios podem estar associados a menor frequência de ciliogénese e a axonemas mais curtos, no entanto, knockout de ATAT1 em ratinhos, a principal N-acetiltransferase da alfa-tubulina na K40, que acetila os microtúbulos, levou à formação de cílios normais, indicando que a acetilação é dispensável para a montagem do cílio (Kalebic et al., 2013). No entanto, em ciliopatias como a Síndrome de *Bardet-Biedl*, a depleção de BBIP10 (Loktev et al., 2008) parece incapacitar a acetilação da tubulina e induzir disfunção ciliar, mas certamente nesta

Síndrome haverá outros condicionamentos à ciliogénese, tais como alterações no transporte intraflagelar, que podem contribuir cumulativamente para a disfunção ciliar. No caso da Síndrome de *Alström*, o mesmo poderá acontecer, mas que tenhamos conhecimento, até à data não foi descrito nenhum fenótipo celular em que mutantes *ALMS1* não apresentassem microtúbulos acetilados. Os resultados obtidos deverão ser confirmados por replicação dos ensaios, e deverá ser ainda feita a marcação do cílio através de um marcador diferente como a tubulina glutamilada, para perceber se os mutantes têm dificuldade em montar cílios, ou em acetilar os mesmos.

6. Conclusões e perspectivas futuras

Com este trabalho pudemos obter evidências de que o cílio primário tem um papel na manutenção de homeostasia das células hTERT-RPE-1 em resposta a níveis elevados de glucose, principalmente quando presente antes da suplementação com a glucose. A presença do cílio e os dados do nosso estudo envolvendo a proteína YAP da via de sinalização Hippo sugerem que o cílio afeta a regulação dos níveis de YAP, potencialmente inibindo a transcrição de genes alvo característicos da regulação por esta proteína, nomeadamente os envolvidos na proliferação, regeneração e diferenciação. Esta hipótese está de acordo com os resultados de progressão no ciclo celular das células hTERT-RPE-1 expostas a elevados níveis de glucose obtidos no curso deste trabalho, e que mostram uma menor tendência para as células progredirem no ciclo celular. A presença dos cílios primários afeta também a regulação do tamanho e granularidade celular. Finalmente, os cílios primários parecem ter um papel normalizador da expressão do marcador de senescência e de reparação de danos na dupla cadeia de DNA, a variante da histona γ -H2AX, em células expostas a elevadas concentrações de glucose.

O isolamento e caracterização inicial de uma linha mutante das células hTERT-RPE-1 heterozigóticas para uma mutação que gera uma proteína ALMS1 truncada, criada com recurso à técnica CRISPR/Cas9, permitiu até agora perceber que o decréscimo dos níveis da proteína ALMS1 normal está associada à ausência de acetilação dos microtúbulos o que poderá ter impacto na cilogénese. Contudo, a caracterização desta linha celular mutante requer uma análise mais detalhada das suas características e de como esta alteração nos níveis da proteína ALMS1 normal afetam a montagem e o funcionamento do cílio. No final desta caracterização, e dependendo dos fenótipos encontrados poderemos usar esta linha celular como modelo para testar como, a impossibilidade de montar cílios ou a presença de cílios disfuncional, afeta a resposta à exposição a elevados níveis de glucose.

No futuro seria relevante conseguirmos fortalecer a relação que este trabalho estabeleceu entre os níveis de glucose, a presença de cílio e a marcação de γ -H2AX. Neste contexto, por exemplo, poderíamos relativamente à senescência celular utilizar outros marcadores característicos de senescência tais como SA- β -gal, pRb, p53, Ki67 e laminina B, e outros marcadores de resposta ao dano no DNA, como Nek1, 53BP1, claspina, Rad51 ou Mre11. Para conseguirmos relacionar diretamente a resposta de γ -H2AX, com a progressão do ciclo celular e com os níveis de YAP seria importante a repetição do ensaio do estudo da localização do YAP e a determinação dos seus níveis em condições de cultura e suplementação exatamente iguais nas células expostas ou

não a elevados níveis de glucose. Mais ainda, para avaliarmos se a variação dos níveis de YAP celular em resposta a elevados níveis de glucose realmente condiciona a expressão de genes associados à proliferação celular e ao controlo do ciclo celular, poderíamos seleccionar genes alvo, tais como por exemplo, a Ciclina E que forma um complexo com a *cinase* Cdk2, o qual é requerido para transição G1/S do ciclo celular e consequente replicação do DNA, a CYR61, a CTGF, a AREG, o proto-oncogene MYC, as proteínas Gli2, efetores da via de sinalização Hedgehog, a proteína dos filamentos intermediários vimentina ou AXL, e realizar RT-PCR para confirmar se há variações na expressão destes genes quando as células são expostas a elevadas concentrações de glucose. Deverá também ser repetido o ensaio por citometria de fluxo de modo a consolidar os resultados obtidos.

7. Referências

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 37, Issue 2, pp. 163–176). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- Álvarez-Satta, M., Lago-Docampo, M., Bea-Mascato, B., Solarat, C., Castro-Sánchez, S., Christensen, S. T., & Valverde, D. (2021). ALMS1 Regulates TGF- β Signaling and Morphology of Primary Cilia. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.623829>
- Andersen, J., Wilkinson, C., Mayor, T., & Mann, M. (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature*, 426(6966), 570–574. <https://doi.org/10.1038/nature02163>
- Anvarian, Z., Mykytyn, K., Mukhopadhyay, S., Pedersen, L. B., & Christensen, S. T. (2019). Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 15(4), 199–219. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0116-9>
- Arsov, T., Silva, D. G., O'Bryan, M. K., Sainsbury, A., Lee, N. J., Kennedy, C., Manji, S. S. M., Nelms, K., Liu, C., Vinuesa, C. G., de Kretser, D. M., Goodnow, C. C., & Petrovsky, N. (2006). Fat aussie - A new Alström syndrome mouse showing a critical role for ALMS1 in obesity, diabetes, and spermatogenesis. *Molecular Endocrinology*, 20(7), 1610–1622. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0494>
- Azevedo, C., Freire, A., Halpern, M., & Quintas, A. (2008). Introdução ao Metabolismo. In *Bioquímica - Organização Molecular da Vida* (pp. 89–97). Lidel.
- Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., Bresolin, S., Frasson, C., Basso, G., Guzzardo, V., Fassina, A., Cordenonsi, M., & Piccolo, S. (2014). YAP/TAZ incorporation in the β -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell*, 158(1), 157–170. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.013>
- Balajee, A. S., & Geard, C. R. (2004). Replication protein a and γ -H2AX foci assembly is triggered by cellular response to DNA double-strand breaks. *Experimental Cell Research*, 300(2), 320–334. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.07.022>
- Baldwin, R. L. (2008). The search for folding intermediates and the mechanism of protein folding. In *Annual Review of Biophysics* (Vol. 37, pp. 1–21). <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.125948>
- Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1997). Oxidative decay of DNA. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 272, Issue 32, pp. 19633–19636). <https://doi.org/10.1074/jbc.272.32.19633>

- Bernadotte, A., Mikhelson, V., & Spivak, I. (2016). Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging*, *8*(1).
- Bettencourt-Dias, M., & Glover, D. M. (2007). Centrosome biogenesis and function: Centrosomics brings new understanding. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 8, Issue 6, pp. 451–463). <https://doi.org/10.1038/nrm2180>
- Bowman, R. J., & Levitt, D. G. (1977). POLYOL PERMEABILITY OF THE HUMAN RED CELL INTERPRETATION OF GLUCOSE TRANSPORT IN TERMS OF A PORE. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 466).
- Breslin, L., Prosser, S. L., Cuffe, S., & Morrison, C. G. (2014). Ciliary abnormalities in senescent human fibroblasts impair proliferative capacity. *Cell Cycle*, *13*(17), 2773–2779. <https://doi.org/10.4161/15384101.2015.945868>
- Busik, J. v., Mohr, S., & Grant, M. B. (2008). Hyperglycemia-Induced reactive oxygen species toxicity to endothelial cells is dependent on paracrine mediators. *Diabetes*, *57*(7), 1952–1965. <https://doi.org/10.2337/db07-1520>
- Castro-sánchez, S., Álvarez-Satta, M., & Valverde, D. (2015). Alström syndrome : current perspectives. *The Application of Clinical Genetics*, *8*, 171–179.
- Chaki, M., Airik, R., Ghosh, A. K., Giles, R. H., Chen, R., Slaats, G. G., Wang, H., Hurd, T. W., Zhou, W., Cluckey, A., Gee, H. Y., Ramaswami, G., Hong, C. J., Hamilton, B. A., Červenka, I., Ganji, R. S., Bryja, V., Arts, H. H., van Reeuwijk, J., ... Hildebrandt, F. (2012). Exome capture reveals ZNF423 and CEP164 mutations, linking renal ciliopathies to DNA damage response signaling. *Cell*, *150*(3), 533–548. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.028>
- Chen, H. Y., Kelley, R. A., Li, T., & Swaroop, A. (2021). Primary cilia biogenesis and associated retinal ciliopathies. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 110, pp. 70–88). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.07.013>
- Collin, G. B., Cyr, E., Bronson, R., Marshall, J. D., Gifford, E. J., Hicks, W., Murray, S. A., Zheng, Q. Y., Smith, R. S., Nishina, P. M., & Naggert, J. K. (2005). Alms1-disrupted mice recapitulate human Alström syndrome. *Human Molecular Genetics*, *14*(16), 2323–2333. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi235>
- Collin, G. B., Marshall, J. D., King, B. L., Milan, G., Maffei, P., Jagger, D. J., & Naggert, J. K. (2012). The alström syndrome protein, ALMS1, interacts with α -actinin and components of the endosome recycling pathway. *PLoS ONE*, *7*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037925>
- Coons, A. H., Creech, H. J., & Jones, R. N. (1941). Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *47*(2), 200–202. <https://doi.org/10.3181/00379727-47-13084P>

- Cox, A. G., Tsomides, A., Yimlamai, D., Hwang, K. L., Miesfeld, J., Galli, G. G., Fowl, B. H., Fort, M., Ma, K. Y., Sullivan, M. R., Hosios, A. M., Snay, E., Yuan, M., Brown, K. K., Lien, E. C., Chhangawala, S., Steinhauser, M. L., Asara, J. M., Houvras, Y., ... Goessling, W. (2018). Yap regulates glucose utilization and sustains nucleotide synthesis to enable organ growth. *The EMBO Journal*, *37*(22). <https://doi.org/10.15252/embj.2018100294>
- DeRan, M., Yang, J., Shen, C. H., Peters, E. C., Fitamant, J., Chan, P., Hsieh, M., Zhu, S., Asara, J. M., Zheng, B., Bardeesy, N., Liu, J., & Wu, X. (2014). Energy stress regulates Hippo-YAP signaling involving AMPK-mediated regulation of angiomin-like 1 protein. *Cell Reports*, *9*(2), 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.036>
- Dircks, C., Williams, E., & Campochiaro, P. (1987). *High Glucose Concentrations Inhibit Protein Synthesis in Retinal Pigment Epithelium In Vitro*.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. In *Science* (Vol. 346, Issue 6213). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Enzo, E., Santinon, G., Pocaterra, A., Aragona, M., Bresolin, S., Forcato, M., Grifoni, D., Pession, A., Zanconato, F., Guzzo, G., Bicciato, S., & Dupont, S. (2015). Aerobic glycolysis tunes YAP / TAZ transcriptional activity . *The EMBO Journal*, *34*(10), 1349–1370. <https://doi.org/10.15252/embj.201490379>
- Eshun-Wilson, L., Zhang, R., Portran, D., Nachury, M. v., Toso, D. B., Löhr, T., Vendruscolo, M., Bonomi, M., Fraser, J. S., & Nogales, E. (2019). Effects of α -tubulin acetylation on microtubule structure and stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(21), 10366–10371. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900441116>
- Farnoodian, M., Halbach, C., Slinger, C., Pattnaik, B. R., Sorenson, C. M., & Sheibani, N. (2016). High glucose promotes the migration of retinal pigment epithelial cells through increased oxidative stress and PEDF expression. *Am J Physiol Cell Physiol*, *311*, 418–436. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00001.2016.-Defects>
- Favaretto, F., Milan, G., Collin, G. B., Marshall, J. D., Stasi, F., Maffei, P., Vettor, R., & Naggert, J. K. (2014). GLUT4 defects in adipose tissue are early signs of metabolic alterations in alms1GT/GT, a mouse model for obesity and insulin resistance. *PLoS ONE*, *9*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109540>
- Fletcher, G. C., Elbediwy, A., Khanal, I., Ribeiro, P. S., Tapon, N., & Thompson, B. J. (2015). The Spectrin cytoskeleton regulates the Hippo signalling pathway. *The EMBO Journal*, *34*(7), 940–954. <https://doi.org/10.15252/embj.201489642>

- Freire, A. P., & Quintas, A. (2008). Proteínas: Estrutura e Função. In *Bioquímica - Organização Molecular de Vida* (pp. 139–316). Lidel.
- Fu, S., Zhang, C., Yan, X., Li, D., Wang, Y., Dong, C., Cao, Z., Ning, Y., Shao, C., & Yang, T. (2021). Primary Cilia as a Biomarker in Mesenchymal Stem Cells Senescence: Influencing Osteoblastic Differentiation Potency Associated with Hedgehog Signaling Regulation. *Stem Cells International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8850114>
- Gaertig, J., & Wloga, D. (2008). Ciliary Tubulin and Its Post-Translational Modifications. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 85, pp. 83–113). [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)00804-1](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)00804-1)
- Ginete, C., Serrasqueiro, B., Silva-Nunes, J., Veiga, L., & Brito, M. (2021). Identification of genetic variants in 65 obesity related genes in a Cohort of Portuguese obese individuals. *Genes*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/genes12040603>
- Girard, D., & Petrovsky, N. (2011). Alström syndrome: Insights into the pathogenesis of metabolic disorders. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 7, Issue 2, pp. 77–88). <https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.210>
- Gómez, A. E., Christman, A. K., van de Weghe, J. C., Finn, M., & Doherty, D. (2022). Systematic analysis of cilia characteristics and Hedgehog signaling in five immortal cell lines. *PLOS ONE*, 17(12), e0266433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266433>
- Gonçalves, J., & Pelletier, L. (2017). The ciliary transition zone: Finding the pieces and assembling the gate. In *Molecules and Cells* (Vol. 40, Issue 4, pp. 243–253). Korean Society for Molecular and Cellular Biology. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0054>
- González-Gualda, E., Baker, A. G., Fruk, L., & Muñoz-Espín, D. (2021). A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *FEBS Journal*, 288(1), 56–80. <https://doi.org/10.1111/febs.15570>
- Graser, S., Stierhof, Y. D., Lavoie, S. B., Gassner, O. S., Lamla, S., le Clech, M., & Nigg, E. A. (2007). Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation. *Journal of Cell Biology*, 179(2), 321–330. <https://doi.org/10.1083/jcb.200707181>
- Grosse Hovest, M., Brü ggenolte, N., Shah Hosseini, K., Krieg, T., & Herrmann, G. (2006). Senescence of Human Fibroblasts after Psoralen Photoactivation Is Mediated by ATR Kinase and Persistent DNA Damage Foci at Telomeres □ D. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 1758–1767. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-08>
- Han, D. J., Aslam, R., Misra, P. S., Chiu, F., Ojha, T., Chowdhury, A., Chan, C. K., Sung, H. K., Yuen, D. A., & Luk, C. T. (2022). Disruption of adipocyte YAP improves

- glucose homeostasis in mice and decreases adipose tissue fibrosis. *Molecular Metabolism*, 66. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101594>
- Hearn, T., Spalluto, C., Phillips, V. J., Renforth, G. L., Copin, N., Hanley, N. A., & Wilson, D. I. (2005). *Subcellular Localization of ALMS1 Supports Involvement of Centrosome and Basal Body Dysfunction in the Pathogenesis of Obesity, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes*. <http://diabetesjournals.org/diabetes/article-pdf/54/5/1581/381719/zdb00505001581.pdf>
- Heydet, D., Chen, L. X., Larter, C. Z., Inglis, C., Silverman, M. A., Farrell, G. C., & Leroux, M. R. (2013). A truncating mutation of *Alms1* reduces the number of hypothalamic neuronal cilia in obese mice. *Developmental Neurobiology*, 73(1), 1–13. <https://doi.org/10.1002/dneu.22031>
- Hildebrandt, F., Benzing, T., & Katsanis, N. (2011). Ciliopathies. *New England Journal of Medicine*, 364(16), 1533–1543. <https://doi.org/10.1056/nejmra1010172>
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. In *Cell* (Vol. 157, Issue 6, pp. 1262–1278). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Hwang, J. H., Kim, A. R., Kim, K. M., il Park, J., Oh, H. T., Moon, S. A., Byun, M. R., Jeong, H., Kim, H. K., Yaffe, M. B., Hwang, E. S., & Hong, J. H. (2019). TAZ couples Hippo/Wnt signalling and insulin sensitivity through *Irs1* expression. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08287-x>
- Ibar, C., & Irvine, K. (2020). Integration of Hippo-YAP Signaling with Metabolism. *CellPress*, 54.
- Ishikawa, H., & Marshall, W. F. (2011). Ciliogenesis: Building the cell's antenna. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 12, Issue 4, pp. 222–234). <https://doi.org/10.1038/nrm3085>
- Jana, S. C. (2021). Centrosome structure and biogenesis: Variations on a theme? In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 110, pp. 123–138). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.10.014>
- Janke, C., & Montagnac, G. (2017). Causes and Consequences of Microtubule Acetylation. In *Current Biology* (Vol. 27, Issue 23, pp. R1287–R1292). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.10.044>
- Jia, L., Gu, W., Zhang, Y., Jiang, B., Qiao, X., & Wen, Y. (2018). Activated yes-associated protein accelerates cell cycle, inhibits apoptosis, and delays senescence in human periodontal ligament stem cells. *International Journal of Medical Sciences*, 15(11), 1241–1250. <https://doi.org/10.7150/ijms.25115>

- Johnson, C. A., & Collis, S. J. (2016). Ciliogenesis and the DNA damage response: A stressful relationship. In *Cilia* (Vol. 5, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13630-016-0040-6>
- Kalebic, N., Sorrentino, S., Perlas, E., Bolasco, G., Martinez, C., & Heppenstall, P. A. (2013). α TAT1 is the major α -tubulin acetyltransferase in mice. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms2962>
- Kang, S. (2021). Adipose tissue malfunction drives metabolic dysfunction in alström syndrome. *Diabetes*, 70(2), 323–325. <https://doi.org/10.2337/dbi20-0041>
- Karaman, R., & Halder, G. (2018). Cell junctions in Hippo signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028753>
- Keeling, J., Tsiokas, L., & Maskey, D. (2016). Cellular mechanisms of ciliary length control. In *Cells* (Vol. 5, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells5010006>
- Kim, J., Jo, H., Hong, H., Kim, M. H., Kim, J. M., Lee, J. K., Heo, W. do, & Kim, J. (2015). Actin remodelling factors control ciliogenesis by regulating YAP/TAZ activity and vesicle trafficking. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7781>
- Kim, M. K., Jang, J. W., & Bae, S. C. (2018). DNA binding partners of YAP/TAZ. In *BMB Reports* (Vol. 51, Issue 3, pp. 126–133). The Biochemical Society of the Republic of Korea. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.3.015>
- Kim, M., Kim, M., Lee, M. S., Kim, C. H., & Lim, D. S. (2014). The MST1/2-SAV1 complex of the Hippo pathway promotes ciliogenesis. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6370>
- Knorz, V. J., Spalluto, C., Lessard, M., Purvis, T. L., Adigun, F. F., Collin, G. B., Hanley, N. A., Wilson, D. I., & Hearn, T. (2010). Centriolar Association of ALMS1 and Likely Centrosomal Functions of the ALMS Motif-containing Proteins C10orf90 and KIAA1731. *Molecular Biology of the Cell*, 21, 3617–3629. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10>
- Lee, C. Y., Dallérac, G., Ezan, P., Anderova, M., & Rouach, N. (2016). Glucose tightly controls morphological and functional properties of astrocytes. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8(APR). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00082>
- Lei, Q.-Y., Zhang, H., Zhao, B., Zha, Z.-Y., Bai, F., Pei, X.-H., Zhao, S., Xiong, Y., & Guan, K.-L. (2008). TAZ Promotes Cell Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition and Is Inhibited by the Hippo Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 28(7), 2426–2436. <https://doi.org/10.1128/mcb.01874-07>
- Leitch, C. C., Lodh, S., Prieto-Echagüe, V., Badano, J. L., & Zaghoul, N. A. (2014). Basal body proteins regulate Notch signaling through endosomal trafficking. *Journal of Cell Science*, 127, 2407–2419. <https://doi.org/10.1242/jcs.130344>

- Ley, S. T., & AbouAlaiwi, W. A. (2019). Primary Cilia are Sensory Hubs for Nitric Oxide Signaling. In K. F. Shad, S. S. S. Saravi, & N. L. Bilgrami (Eds.), *Basic and Clinical Understanding of Microcirculation*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89680>
- Li, G., Vega, R., Nelms, K., Gekakis, N., Goodnow, C., McNamara, P., Wu, H., Hong, N. A., & Glynn, R. (2007). A role for Alström syndrome protein, Alms1, in kidney ciliogenesis and cellular quiescence. *PLoS Genetics*, *3*(1), 0009–0020. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030008>
- Lim, S. K., Park, M. J., Lim, J. C., Kim, J. C., Han, H. J., Kim, G. Y., Cravatt, B. F., Woo, C. H., Ma, S. J., Yoon, K. C., & Park, S. H. (2012). Hyperglycemia induces apoptosis via CB 1 activation through the decrease of FAAH 1 in retinal pigment epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, *227*(2), 569–577. <https://doi.org/10.1002/jcp.22756>
- Liu, X. (2013). Side-scattered Light (SSC). In W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K.-H. Cho, & H. Yokota (Eds.), *Encyclopedia of Systems Biology* (p. 1934). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7_1081
- Loktev, A. v., Zhang, Q., Beck, J. S., Searby, C. C., Scheetz, T. E., Bazan, J. F., Slusarski, D. C., Sheffield, V. C., Jackson, P. K., & Nachury, M. v. (2008). A BBSome Subunit Links Ciliogenesis, Microtubule Stability, and Acetylation. *Developmental Cell*, *15*(6), 854–865. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.11.001>
- Maréchal, A., & Zou, L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012716>
- Marion, V., Stoetzel, C., Schlicht, D., Messaddeq, N., Koch, M., Flori, E., Danse, J. M., Mandel, J.-L., & Lè Ne Dollfus, H. (2008). *Transient ciliogenesis involving Bardet-Biedl syndrome proteins is a fundamental characteristic of adipogenic differentiation*. <http://www.bowserlab.org/primarycilia/cilialist.html>
- Marshall, J. D., Muller, J., Collin, G. B., Milan, G., Kingsmore, S. F., Dinwiddie, D., Farrow, E. G., Miller, N. A., Favaretto, F., Maffei, P., Dollfus, H., Vettor, R., & Naggert, J. K. (2015). Alström Syndrome: Mutation Spectrum of ALMS1. *Human Mutation*, *36*(7), 660–668. <https://doi.org/10.1002/humu.22796>
- Masyuk, A. I., Masyuk, T. v., Splinter, P. L., Huang, B. Q., Stroope, A. J., & Larusso, N. F. (2006). Cholangiocyte Cilia Detect Changes in Luminal Fluid Flow and Transmit Them into Intracellular Ca²⁺ and cAMP Signaling. *Gastroenterology*, *131*(3), 911–920.
- Maugeri, G., D'Amico, A. G., Rasà, D. M., la Cognata, V., Saccone, S., Federico, C., Cavallaro, S., & D'Agata, V. (2017). Nicotine promotes blood retinal barrier damage

- in a model of human diabetic macular edema. *Toxicology in Vitro*, *44*, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.07.003>
- May-Simera, H. L., Wan, Q., Jha, B. S., Hartford, J., Khristov, V., Dejene, R., Chang, J., Patnaik, S., Lu, Q., Banerjee, P., Silver, J., Insinna-Kettenhofen, C., Patel, D., Lotfi, M., Malicdan, M., Hotaling, N., Maminishkis, A., Sridharan, R., Brooks, B., ... Bharti, K. (2018). Primary Cilium-Mediated Retinal Pigment Epithelium Maturation Is Disrupted in Ciliopathy Patient Cells. *Cell Reports*, *22*(1), 189–205. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.038>
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nature Methods*, *19*(6), 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
- Misra, J. R., & Irvine, K. D. (2018). *The Hippo Signaling Network and its Biological Functions*. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417>
- Mo, J. S., Meng, Z., Kim, Y. C., Park, H. W., Hansen, C. G., Kim, S., Lim, D. S., & Guan, K. L. (2015). Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway. *Nature Cell Biology*, *17*(4), 500–510. <https://doi.org/10.1038/ncb3111>
- Moeglin, E., Desplancq, D., Conic, S., Oulad-Abdelghani, M., Stoessel, A., Chipper, M., Vigneron, M., Didier, P., Tora, L., & Weiss, E. (2019). Uniform widespread nuclear phosphorylation of histone H2AX is an indicator of lethal DNA replication stress. *Cancers*, *11*(3). <https://doi.org/10.3390/cancers11030355>
- Morgan, A. A., & Rubenstein, E. (2013). Proline: The Distribution, Frequency, Positioning, and Common Functional Roles of Proline and Polyproline Sequences in the Human Proteome. *PLoS ONE*, *8*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053785>
- Morrison, C. G. (2021). Primary cilia and the DNA damage response: linking a cellular antenna and nuclear signals. *Biochemical Society Transactions*, *49*(2), 829–841. <https://doi.org/10.1042/BST20200751>
- Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., & Serrano, M. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, *155*(5), 1104. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.019>
- Nauli, S. M., Jin, X., Aboualawi, W. A., El-Jouni, W., Su, X., & Zhou, J. (2013). Non-motile primary cilia as fluid shear stress mechanosensors. In *Methods in Enzymology* (Vol. 525, pp. 1–20). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397944-5.00001-8>

- Neurohr, G. E., Terry, R. L., Lengefeld, J., Bonney, M., Brittingham, G. P., Moretto, F., Miettinen, T. P., Vaites, L. P., Soares, L. M., Paulo, J. A., Harper, J. W., Buratowski, S., Manalis, S., van Werven, F. J., Holt, L. J., & Amon, A. (2019). Excessive Cell Growth Causes Cytoplasm Dilution And Contributes to Senescence. *Cell*, *176*(5), 1083-1097.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.018>
- Nicolas, A., Delalande, O., Hubert, J. F., & le Rumeur, E. (2014). The spectrin family of proteins: A unique coiled-coil fold for various molecular surface properties. *Journal of Structural Biology*, *186*(3), 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.03.011>
- Orhon, I., Dupont, N., Zaidan, M., Boitez, V., Burtin, M., Schmitt, A., Capiod, T., Viau, A., Beau, I., Wolfgang Kuehn, E., Friedlander, G., Terzi, F., & Codogno, P. (2016). Primary-cilium-dependent autophagy controls epithelial cell volume in response to fluid flow. *Nature Cell Biology*, *18*(6), 657–667. <https://doi.org/10.1038/ncb3360>
- Paisey, R., Steeds, R., Barret, T., & Gunay-Aygun, M. (2003). *Alström Syndrome*.
- Plotnikova, O. v., Pugacheva, E. N., & Golemis, E. A. (2009). Primary cilia and the cell cycle. *Methods in Cell Biology*, *94*, 137–160. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)94007-3](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)94007-3)
- Pospelova, T. v., Demidenko, Z. N., Bukreeva, E. I., Pospelov, V. A., Gudkov, A. v., & Blagosklonny, M. v. (2009). Pseudo-DNA damage response in senescent cells. In *Cell Cycle* (Vol. 8, Issue 24, pp. 4112–4118). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/cc.8.24.10215>
- Rausch, V., & Hansen, C. G. (2020). The Hippo Pathway, YAP/TAZ, and the Plasma Membrane. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 30, Issue 1, pp. 32–48). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.10.005>
- Redon, C. E., Nakamura, A. J., Sordet, O., Dickey, J. S., Gouliaeva, K., Tabb, B., Lawrence, S., Kinders, R. J., Bonner, W. M., & Sedelnikova, O. A. (2011). γ -H2AX Detection in Peripheral Blood Lymphocytes, Splenocytes, Bone Marrow, Xenografts, and Skin. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 682, pp. 249–270). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-409-8_18
- Reiter, J. F., & Leroux, M. R. (2017). Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *18*(9), 533–547. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.60>
- Ribeiro, A., Oliveira, C., Quintas, A., Freire, A., & Halpern, M. (2008). Integração do Metabolismo - Biossinalização. In *Bioquímica - Organização Molecular de Vida* (pp. 619–646). Lidel.
- Romano, S., Milan, G., Veronese, C., Collin, G., Marshall, J., & Vettor, R. (2008). Regulation of Alström syndrome gene expression during adipogenesis and its

- relationship with fat cell insulin sensitivity. *International Journal of Molecular Medicine*, 21, 731–736.
- Salmon, T. B., Evert, B. A., Song, B., & Doetsch, P. W. (2004). Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 32(12), 3712–3723. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh696>
- Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2012). Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. In *Cell* (Vol. 148, Issue 5, pp. 852–871). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.017>
- Santinon, G., Pocaterra, A., & Dupont, S. (2016). Control of YAP/TAZ Activity by Metabolic and Nutrient-Sensing Pathways. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 26, Issue 4, pp. 289–299). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.11.004>
- Satir, P., & Christensen, S. T. (2007). Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annual Review of Physiology*, 69, 377–400. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236>
- Sedelnikova, O. A., Horikawa, I., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., Bonner, W. M., & Barrett, J. C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nature Cell Biology*, 6(2), 168–170. <https://doi.org/10.1038/ncb1095>
- Sharma, A., Singh, K., & Almasan, A. (2012). Histone H2AX phosphorylation: A marker for DNA damage. *Methods in Molecular Biology*, 920, 613–626. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-998-3_40
- Shenje, L. T., Andersen, P., Halushka, M. K., Lui, C., Fernandez, L., Collin, G. B., Amat-Alarcon, N., Meschino, W., Cutz, E., Chang, K., Yonescu, R., Batista, D. A. S., Chen, Y., Chelko, S., Crosson, J. E., Scheel, J., Vricella, L., Craig, B. D., Marosy, B. A., ... Judge, D. P. (2014). Mutations in Alström protein impair terminal differentiation of cardiomyocytes. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4416>
- Sherwood, S. W., Rush, D., Ellsworth, J. L., & Schimke, R. T. (1988). Defining cellular senescence in IMR-90 cells: A flow cytometric analysis. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 85).
- Shiba, D., Takamatsu, T., & Yokoyama, T. (2005). Primary Cilia of *inv/inv* Mouse Renal Epithelial Cells Sense Physiological Fluid Flow: Bending of Primary Cilia and Ca²⁺ Influx. In *CELL STRUCTURE AND FUNCTION* (Vol. 30).
- Siroky, B. J., Kleene, N. K., Kleene, S. J., Varnell, C. D., Comer, R. G., Liu, J., Lu, L., Pachciarz, N. W., Bissler, J. J., & Dixon, B. P. (2017). Primary cilia regulate the osmotic stress response of renal epithelial cells through TRPM3. *Am J Physiol Renal Physiol*, 312, 791–805. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00465.2015.-Pri>

- Sivasubramaniam, S., Sun, X., Pan, Y. R., Wang, S., & Lee, E. Y. H. P. (2008). Cep164 is a mediator protein required for the maintenance of genomic stability through modulation of MDC1, RPA, and CHK1. *Genes and Development*, 22(5), 587–600. <https://doi.org/10.1101/gad.1627708>
- Slaats, G. G., Saldivar, J. C., Bacal, J., Zeman, M. K., Kile, A. C., Hynes, A. M., Srivastava, S., Nazmutdinova, J., den Ouden, K., Zagers, M. S., Foletto, V., Verhaar, M. C., Miles, C., Sayer, J. A., Cimprich, K. A., & Giles, R. H. (2015). DNA replication stress underlies renal phenotypes in CEP290-Associated Joubert syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 125(9), 3657–3666. <https://doi.org/10.1172/JCI80657>
- Soares, H., Carmona, B., Nolasco, S., & Viseu Melo, L. (2019). Polarity in Ciliate Models: From Cilia to Cell Architecture. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 7). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00240>
- Song, D. K., Choi, J. H., & Kim, M. S. (2018). Primary cilia as a signaling platform for control of energy metabolism. *Diabetes and Metabolism Journal*, 42(2), 117–127. <https://doi.org/10.4093/dmj.2018.42.2.117>
- Soutoglou, E. (2008). DNA lesions and DNA damage response: Even long lasting relationships need a “break.” In *Cell Cycle* (Vol. 7, Issue 23, pp. 3653–3658). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/cc.7.23.7178>
- Soutoglou, E., & Misteli, T. (2008). Activation of the cellular DNA damage response in the absence of DNA lesions. *Science*, 320(5882), 1507–1510. <https://doi.org/10.1126/science.1159051>
- Staples, C. J., Myers, K. N., Beveridge, D. D., Patil, A. A., Howard, A. E., Barone, G., X Lee, A. J., Swanton, C., Howell, M., Maslen, S., Mark Skehel, J., Boulton, S. J., & Collis, S. J. (2014). *Ccdc13; a novel human centriolar satellite protein required for ciliogenesis and genome stability*.
- Staples, C. J., Myers, K. N., Beveridge, R. D. D., Patil, A. A., Lee, A. J. X., Swanton, C., Howell, M., Boulton, S. J., & Collis, S. J. (2012). The centriolar satellite protein Cep131 is important for genome stability. *Journal of Cell Science*, 125(20), 4770–4779. <https://doi.org/10.1242/jcs.104059>
- Stieger, N., Worthmann, K., Teng, B., Engeli, S., Das, A. M., Haller, H., & Schiffer, M. (2012). Impact of high glucose and transforming growth factor- β on bioenergetic profiles in podocytes. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 61(8), 1073–1086. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2011.12.003>
- Straßburger, K., Tiebe, M., Pinna, F., Breuhahn, K., & Teleman, A. A. (2012). Insulin/IGF signaling drives cell proliferation in part via Yorkie/YAP. *Developmental Biology*, 367(2), 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.05.008>

- Strauss, O. (2005). *The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function*.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2004.-Located>
- Sun, C., Zhou, J., & Meng, X. (2021). Primary cilia in retinal pigment epithelium development and diseases. In *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (Vol. 25, Issue 19, pp. 9084–9088). John Wiley and Sons Inc.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.16882>
- Suvarna, S. K., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2013). Immunofluorescent techniques. In *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques* (7th ed., pp. 432–439). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4226-3.00002-0>
- Tanaka, T., Kurose, A., Halicka, H. D., Traganos, F., & Darzynkiewicz, Z. (2006). 2-Deoxy-D-glucose reduces the level of constitutive activation of ATM and phosphorylation of histone H2AX. *Cell Cycle*, 5(8), 878–882.
<https://doi.org/10.4161/cc.5.8.2681>
- Tavares, A., Gonçalves, J., Florindo, C., Tavares, Á. A., & Soares, H. (2012). Mob1: Defining cell polarity for proper cell division. *Journal of Cell Science*, 125(2), 516–527. <https://doi.org/10.1242/jcs.096610>
- Tobin, J. L., & Beales, P. L. (2009). The nonmotile ciliopathies. In *Genetics in Medicine* (Vol. 11, Issue 6, pp. 386–402). <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181a02882>
- Totaro, A., Panciera, T., & Piccolo, S. (2018). YAP/TAZ upstream signals and downstream responses. In *Nature Cell Biology* (Vol. 20, Issue 8, pp. 888–899). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0142-z>
- Valdés-Sánchez, L., de la cerda, B., Diaz-Corrales, F. J., Massalini, S., Chakarova, C. F., Wright, A. F., & Bhattacharya, S. S. (2013). ATR localizes to the photoreceptor connecting cilium and deficiency leads to severe photoreceptor degeneration in mice. *Human Molecular Genetics*, 22(8), 1507–1515.
<https://doi.org/10.1093/hmg/dds563>
- Varelas, X. (2014). The hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. In *Development (Cambridge)* (Vol. 141, Issue 8, pp. 1614–1626). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/dev.102376>
- Varelas, X., Samavarchi-Tehrani, P., Narimatsu, M., Weiss, A., Cockburn, K., Larsen, B. G., Rossant, J., & Wrana, J. L. (2010). The Crumbs Complex Couples Cell Density Sensing to Hippo-Dependent Control of the TGF- β -SMAD Pathway. *Developmental Cell*, 19(6), 831–844. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.11.012>
- Vermezovic, J., Adamowicz, M., Santarpia, L., Rustighi, A., Forcato, M., Lucano, C., Massimiliano, L., Costanzo, V., Bicciato, S., del Sal, G., & D'Adda Di Fagagna, F. (2015). Notch is a direct negative regulator of the DNA-damage response. *Nature*

- Structural and Molecular Biology*, 22(5), 417–424.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.3013>
- Villarroel, M., García-Ramírez, M., Corraliza, L., Hernández, C., & Simó, R. (2009). Effects of high glucose concentration on the barrier function and the expression of tight junction proteins in human retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research*, 89(6), 913–920. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.07.017>
- Wang, W., Xiao, Z. D., Li, X., Aziz, K. E., Gan, B., Johnson, R. L., & Chen, J. (2015). AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nature Cell Biology*, 17(4), 490–499. <https://doi.org/10.1038/ncb3113>
- Waters, A. M., & Beales, P. L. (2011). Ciliopathies: An expanding disease spectrum. *Pediatric Nephrology*, 26(7), 1039–1056. <https://doi.org/10.1007/s00467-010-1731-7>
- Weller, T., & Coons, A. (1954). Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 86, 789–794.
- Wheway, G., Nazlamova, L., & Hancock, J. T. (2018). Signaling through the primary cilium. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 6, Issue FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00008>
- Xie, Q., Chen, J., Feng, H., Peng, S., Adams, U., Bai, Y., Huang, L., Li, J., Huang, J., Meng, S., & Yuan, Z. (2013). YAP/TEAD-mediated transcription controls cellular senescence. *Cancer Research*, 73(12), 3615–3624. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3793>
- Yan, C., Wang, F., Peng, Y., Williams, C. R., Jenkins, B., Wildonger, J., Kim, H. J., Perr, J. B., Vaughan, J. C., Kern, M. E., Falvo, M. R., O'Brien, E. T., Superfine, R., Tuthill, J. C., Xiang, Y., Rogers, S. L., & Parrish, J. Z. (2018). Microtubule Acetylation Is Required for Mechanosensation in *Drosophila*. *Cell Reports*, 25(4), 1051-1065.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.075>
- Yang, D. J., Hong, J., & Kim, K. W. (2021). Hypothalamic primary cilium: A hub for metabolic homeostasis. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 53, Issue 7, pp. 1109–1115). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00644-5>
- Zhang, X., Qiao, Y., Wu, Q., Chen, Y., Zou, S., Liu, X., Zhu, G., Zhao, Y., Chen, Y., Yu, Y., Pan, Q., Wang, J., & Sun, F. (2017). The essential role of YAP O-GlcNAcylation in high-glucose-stimulated liver tumorigenesis. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms15280>
- Zhang, X., Zhao, H., Li, Y., Xia, D., Yang, L., Ma, Y., & Li, H. (2018). The role of YAP/TAZ activity in cancer metabolic reprogramming. In *Molecular Cancer* (Vol. 17, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0882-1>

- Zheng, Y., & Pan, D. (2019). The Hippo Signaling Pathway in Development and Disease. In *Developmental Cell* (Vol. 50, Issue 3, pp. 264–282). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.06.003>
- Zhong, A., Chang, M., Yu, T., Gau, R., Riley, D. J., Chen, Y., & Chen, P.-L. (2018). Aberrant DNA damage response and DNA repair pathway in high glucose conditions. *J Can Res Updates*, 7(3), 64–74.
- Zulato, E., Favaretto, F., Veronese, C., Campanaro, S., Marshall, J. D., Romano, S., Cabrelle, A., Collin, G. B., Zavan, B., Belloni, A. S., Rampazzo, E., Naggert, J. K., Abatangelo, G., Sicolo, N., Maffei, P., Milan, G., & Vettor, R. (2011). ALMS1-deficient fibroblasts over-express extra-cellular matrix components, display cell cycle delay and are resistant to apoptosis. *PLoS ONE*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019081>