

Universidade do Algarve
Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina



**ANÁLISE DA FUNÇÃO DO GENE HSMOB2 EM
CÉLULAS HUMANAS, POR MICROSCOPIA**

Carolina Rita Salteiro
Mestrado em Ciências Biomédicas
2011

Universidade do Algarve
Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina



**ANÁLISE DA FUNÇÃO DO GENE HSMOB2 EM
CÉLULAS HUMANAS, POR MICROSCOPIA**

Dissertação orientada pelo Professor Doutor Álvaro Tavares
Centro de Biomedicina Molecular e Estrutural, Universidade do Algarve

Carolina Rita Salteiro
Mestrado em Ciências Biomédicas

2011

ÍNDICE DE CONTEÚDOS

	Página
Agradecimentos	IV
Índice de figuras e tabelas	V
Abreviaturas	VIII
Resumo e palavras-chave	IX
Abstract and keywords	X
1. Introdução	1
1.1. Ciclo celular	1
1.1.1. Fases do Ciclo Celular	1
1.1.2. Mitose	2
1.1.3. Fases mitóticas	2
1.1.4. Citocinese	3
1.1.5. Entrada em mitose	4
1.1.6. Saída de mitose	5
1.1.7. Centrossomas no ciclo celular	5
1.2. Mob	6
1.2.1. Os Mob2 em diferentes organismos	7
1.2.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
1.2.1.2. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	7
1.2.1.3. <i>Tetrahymena thermophila</i>	8
1.2.1.4. <i>Trypanosoma brucei</i>	8
1.2.1.5. <i>Drosophila melanogaster</i>	8
1.2.1.6. <i>Homo sapiens</i>	9
1.2.1.6.1. hsMob1	9
1.2.1.6.2. hsMob4	10
1.2.1.6.3. hsMob2	11
2. Materiais e Métodos	15
2.1. Material biológico	15
2.2. Manipulação de células de Mamíferos	15
2.2.1. Semear células em placas	15
2.2.2. Preparação de lamelas com polielisina	16
2.2.3. Sincronização de células	16

2.2.4. Transfecções de DNA plasmídico em células HeLa	16
2.2.5. Imunofluorescência:	16
2.2.5.1. Fixação com Metanol/Acetona:	17
2.2.5.2. Fixação com Metanol/Acetona e PEM-Glicerol:	18
2.2.5.3. Fixação com Paraformaldeído:	18
2.3. Manipulação de proteínas	18
2.3.1. Recolha de células:	18
2.3.2. Géis de proteínas e Western Blots	19
2.3.2.1. Preparação das amostras:	19
2.3.2.2. Gel de proteínas (SDS-PAGE)	19
2.3.2.3. Western-blot	19
2.3.2.4. Stripping da Membrana de Western Blot	20
2.3.2.4.1. com Glicina:	20
2.3.2.4.2. com β -Mercaptoetanol:	20
2.3.2.5. Quantificação da intensidade das bandas dos Western Blots	21
2.4. A técnica de RNAi	21
2.4.1. Transfecção do duplex de RNAi para Western-Blot	21
2.4.2. Transfecção do duplex de RNAi para imunofluorescência	22
2.5. Anticorpos e vectores	22
2.5.1. Anticorpos primários	22
2.5.2. Anticorpos secundários	22
2.5.3. Vectores	23
2.6. Técnicas Variadas	23
2.6.1. Manipulação de bactérias – Transformação	23
2.6.2. Clonagem	23
2.6.3. Restrições e Análise DNA:	24
2.6.4. Gel de Agarose para electrofosere	24
2.6.5. PCR (polymerase chain reaction):	24
3. Resultados	25
3.1. Caracterização dos soros anti-hsMob2	25
3.1.1. Especificidade dos soros ACR40 e ACR41 no reconhecimento da proteína hsMob2	25
3.2. Localização intracelular da proteína hsMob2	26

3.2.1. Imunolocalização de hsMob2	31
3.2.1.1. ACR40	31
3.2.1.2. ACR41	31
3.2.1.3. Expressão transiente da proteína de fusão hsGFP.Mob2	32
3.3. Clonagem Mob2 em pENTR4	40
4. Discussão	43
4.1. Especificidade dos soros policlonais ACR40 e ACR41	43
4.2. Toxicidade celular da proteína hsMob2	44
4.3. Imunolocalização intracelular da proteína hsMob2	44
4.4. Imunolocalização da proteína de fusão GFP.hsMob2 ao longo do ciclo celular	45
4.5. Localização dinâmica da hsMob2	45
5. Perspectivas futuras	47
6. Bibliografia	48
7. Anexos	53
7.1. Clones de DNA	53

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, o Professor Doutor Álvaro Tavares, pelo entusiasmo sempre presente, e por me ter ensinado a ser sempre melhor. Obrigada pela oportunidade de entrar na Ciência através do Ciclo Celular;

À Cláudia Florindo, por toda a paciência, por me ter transmitido o sentido prático de responsabilidade, pelos “ralhetes” com impacto positivo, e por toda a companhia;

Aos vários grupos membros do Centro de Biomedicina Molecular Estrutural, em especial ao grupo do professor José Bragança, da professora Isabel Palmeirim, e do professor José Belo, pelos empréstimos, conselhos e pelo convívio;

Ao professor José Bragança, por toda a simpatia e amizade;

Aos técnicos Maurícia, André, Cláudia e Ana Luísa, pelo acolhimento e por toda a ajuda;

À Ivette, à Catarina e à Patrícia, pelos risos alegres que se ouvem ao longo do corredor;

À Lisa e ao Tomás, pelos ovos, pela ajuda e pela empatia;

Aos meus colegas, Marlene Trindade, Telmo Moedas e Cláudia Fonseca, pela amizade, boa disposição, companhia e ânimo, ao longo deste ano lectivo;

Ao Rui, por o ter encontrado;

Aos meus pais, que sempre presentes me deram total apoio durante toda esta etapa;

E por último ao Orpheu, por todos os dias de compreensão e companhia.

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

1. Introdução

Figura 1	As 4 fases do ciclo celular	2
Figura 2	Etapas da Mitose	3
Figura 3	Os diferentes estádios da citocinese.	4
Figura 4	Imunofluorescência de células HeLa em profase com Mob2RNAi.	12
Figura 5	Imunofluorescência de células HeLa em pró-metáfase com Mob2RNAi.	13
Figura 6	Imunofluorescência de células HeLa com Mob2RNAi e imunolocalização da γ -tubulina.	13
Figura 7	Representação esquemática da correcta separação dos centrossomas, desde a fase G1 até à prometáfase	14

2. Materiais e Métodos

Tabela 1	Oligonucleotídeos de siRNA utilizados na técnica de RNAi	21
Tabela 2	Anticorpos primários utilizados.	22
Tabela 3	Anticorpos secundários utilizados.	22
Tabela 4	Vectores utilizados em diferentes experiências, consoante os objectivos.	23
Tabela 5	Oligonucleotídeos de DNA utilizados.	24

3. Resultados

Figura 8	Sequência de aminoácidos da proteína hsMob2.	25
Figura 9	Análise por Western Blot do soro anti-Mob2 ACR40 e do anticorpo anti-GFP.	27
Figura 10	Análise por Western Blot do soro anti-Mob2 ACR41 e do anticorpo anti-GFP.	27
Figura 11	Eficiência de transfecção de células HeLa com oligos de RNAi, 2 dias-pós-transfecção (d.p.t.), 3 d.p.t. e 4 d.p.t.	28
Figura 12	Géis de poliacrilamida corados com solução	28

comassie-blue, para quantificação relativa de proteína por poço.

Figura 13	Mebrana de Western-blot incubada com ACR40.	30
Figura 14	Mebrana de Western-blot incubada com ACR41.	30
Tabela 6	Resumo da localização do hsMob2 ao longo do ciclo celular.	33
Figura 15	Localização intracelular do ACR40 ao longo do ciclo celular.	34
Figura 16	Localização intracelular do ACR40 em células em citocinese.	35
Figura 17	Localização intracelular do ACR40 em células em interfase.	35
Figura 18	Localização intracelular do ACR41 ao longo do ciclo celular	36
Figura 19	Localização intracelular do ACR41 em células em citocinese.	37
Figura 20	Localização intracelular do ACR41 em células em interfase.	37
Figura 21	Localização intracelular do ACR41 em células em metafase	38
Figura 22	Localização intracelular do Mob2GFP em células em citocinese.	38
Figura 23	Localização intracelular do Mob2GFP em células em citocinese.	39
Figura 24	Localização intracelular do Mob2GFP em células em interfase, com incubação com MKPL1	39
Figura 25	Representação esquemática do vector pENTR4, do Mob2 e do clone que se quer obter pENTR4-Mob2.	40

Figura 26 Gel de Agarose. Verificação da clonagem do Mob2 em pENTR4. 41

Figura 27 Gel de Agarose. Clonagem do Mob2 em pENTR4. 42

4. Discussão

Figura 28 Hipótese esquematizada da localização da proteína hsMob2 ao longo do ciclo celular. 46

ABREVIATURAS

APC	Complexo Promotor da Anafase (do inglês, <u>A</u> naphase <u>P</u> romoter <u>C</u> omplex)
Cdk	Cinase dependente de ciclinas (do inglês, <u>C</u> yclin- <u>d</u> ependent <u>k</u> inases)
MEN	Via de saída de mitose (do inglês, <u>M</u> itotic <u>E</u> xit <u>N</u> etwork)
MKPL1	Do inglês, <u>M</u> itotic <u>K</u> inesin- <u>l</u> ike <u>p</u> rotein <u>I</u>
MOB	Do inglês, <u>M</u> ps <u>O</u> ne <u>B</u> inder
MPF	Factor promotor da fase M (do inglês, <u>M</u> -phase <u>P</u> romoting <u>F</u> actor)
PCM	Material pericentriolar (do inglês, <u>P</u> ericentriolar <u>m</u> aterial)
SIN	Do inglês, <u>S</u> eptation <u>I</u> nitiation <u>N</u> etwork
SPB	Corpo polar do fuso (do inglês, <u>S</u> pindle <u>P</u> ole <u>B</u> ody)

RESUMO

Uma divisão celular bem sucedida depende de uma coordenação precisa da mitose. Sabe-se que a levedura *S. cerevisiae* tem um gene – Mob1 – que codifica para uma proteína reguladora, essencial para a saída da mitose.

Em humanos existem 7 genes do tipo Mob1, sobre os quais ainda há pouca informação. Estudos preliminares realizados em células humanas indicaram que o gene humano Mob2 é essencial para a realização da mitose, mais concretamente para a correcta formação do fuso mitótico, afectando posteriormente o alinhamento e a segregação dos cromossomas. A função do gene hsMob2 parece ser essencial para a organização dos centrossomas. Isto sugere que o gene hsMob2 possa ser um dos causadores da instabilidade genómica observada, por exemplo, em células cancerosas.

Neste projecto pretendeu-se compreender qual é a função do gene hsMob2. Para isso, optou-se por determinar a localização intracelular da proteína codificada pelo gene hsMob2, recorrendo a técnicas de imunofluorescência e imunolocalização.

Concluiu-se que a proteína hsMob2 tem uma localização intracelular dinâmica, localizando no corpo central e nos centrossomas. Para além disto a proteína hsMob2 parece também estar presente no fuso mitótico (em metafase) e na zona central do fuso (em anafase).

PALAVRAS-CHAVE: Mob2; Ciclo celular; Mitose; Centrossomas; Corpo central; Fuso mitótico.

ABSTRACT

A successful cell division depends on the strict coordination of mitosis. It's known that the gene Mob1, in *S. cerevisiae*, codifies for a regulator protein central for cells to exit mitosis and enter interphase.

Humans have 7 Mob1-like genes, but information on them is still scarce. Preliminary studies in our group, revealed that the human gene Mob2 is essential to mitosis, particularly for proper mitotic spindle formation, chromosome alignment and segregation. The hsMob2 gene function seems to be vital to the centrosomes organization. This suggests that hsMob2 gene can be a source for genomic instability factors observed in tumor cells.

This project's main goal was to understand the hsMob2 gene function. By using immunolocalization and immunofluorescence techniques, we tried to determine the intracellular localization of hsMob2 protein, codified by hsMob2 gene.

We were able to conclude that the hsMob2 protein has a dynamic intracellular localization, found both in the cellular midbody and on centrosomes. Furthermore, the hsMob2 protein seems to be located in the mitotic spindle (during metaphase) and in the spindle's midzone (during anaphase).

KEYWORDS: Mob2; Cell cycle; Mitosis; Centrosomes; Midbody; Mitotic spindle.

1. INTRODUÇÃO

Um dos mecanismos responsáveis pela perpetuação das células é a mitose – processo responsável pela divisão celular. A mitose permite que uma célula mãe dê origem a duas células filhas, exactamente com a mesma informação genética. Isto possibilita que haja uma renovação da massa celular dos organismos e uma manutenção ou readaptação das características adquiridas ao longo de gerações, sendo por isso a mitose um mecanismo essencial à vida.

A mitose pode acontecer em benefício da evolução dos organismos ou, caso haja algum defeito no processo, pode ser a causa de algumas anomalias, como por exemplo trissomias ou massas tumorais. Devido à sua relevância, torna-se necessário investigar os mecanismos envolvidos ao longo da divisão celular.

1.1. Ciclo celular

O ciclo celular é um processo conservado, durante o qual as estruturas internas da célula se reorganizam, promovendo uma divisão correcta das células, através de uma coordenação precisa dos eventos no ciclo celular, incluindo a duplicação dos centróssomas e cromossomas, a segregação dos cromossomas e a citocinese. Estes eventos estão distribuídos por várias fases ao longo do ciclo celular.

1.1.1. Fases do Ciclo Celular

O ciclo celular está dividido em quatro fases: fase G1 (do inglês, *gap 1*), fase S (síntese de DNA), fase G2 e fase M (mitótica, da qual fazem parte a mitose e a citocinese) (**Figura 1**). O ciclo celular também pode ser dividido de forma mais genérica, em duas fases: interfase (correspondente às fases G1, S e G2) e mitose.

A **fase G1** é a que tem uma duração mais variável, consoante o tipo de célula e o organismo a que pertence. Nesta fase há síntese de RNA e de proteínas (que se vai prolongar até à fase M), havendo desta forma preparação celular para a fase seguinte. Há um aumento dos conteúdos celulares, e consequentemente um aumento do tamanho da célula. Algumas células podem sair do ciclo celular quando estão na fase G1, ficando presas num estado quiescente

chamado fase G₀. Na **fase S**, que em células somáticas de mamíferos dura aproximadamente 8 horas, ocorre síntese de DNA, sendo cada um dos cromatídeos duplicado, tal como os centróssomas. Na **fase G₂**, que varia entre 30 a 90 minutos em células somáticas de mamíferos, já não há síntese de DNA, e a célula prepara-se para se dividir fisicamente. Na **fase M**, a mitose

inicia-se com a profase, terminando na telofase, não havendo síntese de DNA durante esta fase. O anel contráctil começa a formar-se durante a anafase, comprimindo o citoplasma, culminando na citocinese, quando se dá uma separação física do citoplasma.

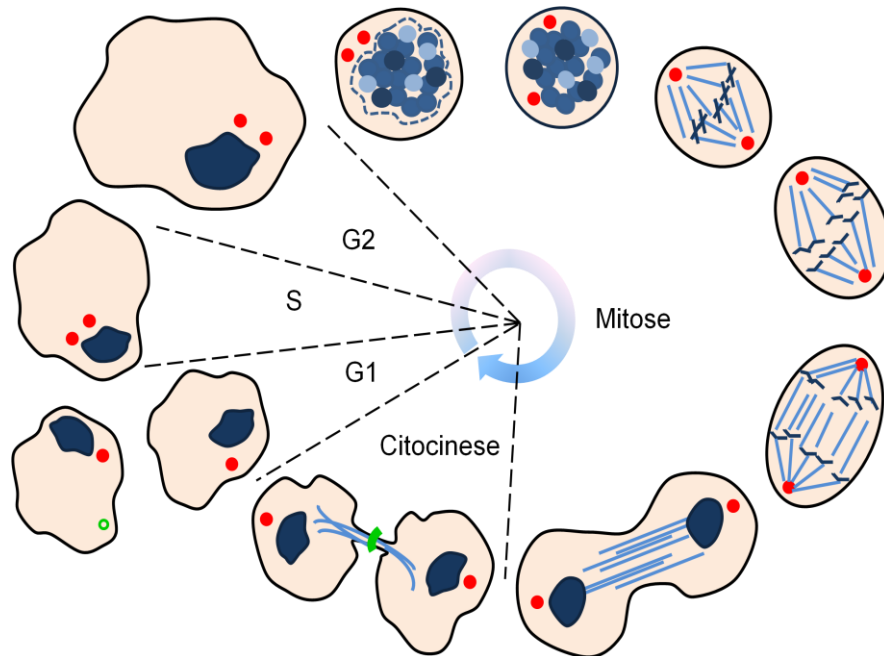


Figura 1 - Representação esquemática das 4 fases do ciclo celular (G₁, S, G₂, e M) (Azul escuro, DNA; Azul claro, microtúbulos; Vermelho, centróssomas; Verde, Midbody; Preto, membrana plasmática). [Representação esquemática por Carolina Salteiro].

1.1.2. Mitose

A mitose é o processo conservado e comum a todos os seres vivos, pelo qual uma célula-mãe separa os cromossomas em duas porções idênticas, permitindo que após uma separação física se originem duas células-filhas diploides. A mitose pode ser agrupada em quatro fases, de acordo com o estado de condensação do DNA.

1.1.3. Fases mitóticas

A mitose está organizada em quatro fases: profase, metafase, anafase e telofase (**Figura 2**). A **profase** é a fase na qual ocorre a condensação da cromatina em cromossomas. No final da

profase há quebra do invólucro nuclear, os microtúbulos ligam-se aos cinetocoros, e o fuso começa a ser formado. Na **metafase**, os cromossomas vão ficar alinhados no centro do fuso mitótico, formando-se assim a placa equatorial. Assim que os cromossomas estiverem todos alinhados, vai haver uma quebra da ligação entre os dois cromátídeos irmãos, os quais são separados, iniciando-se a **anafase**, com os cromátídeos irmãos a se deslocarem para os lados opostos do fuso alongado. Na **telofase** há reorganização da membrana nuclear, o fuso mitótico desaparece e os cromátídeos sofrem descondensação.

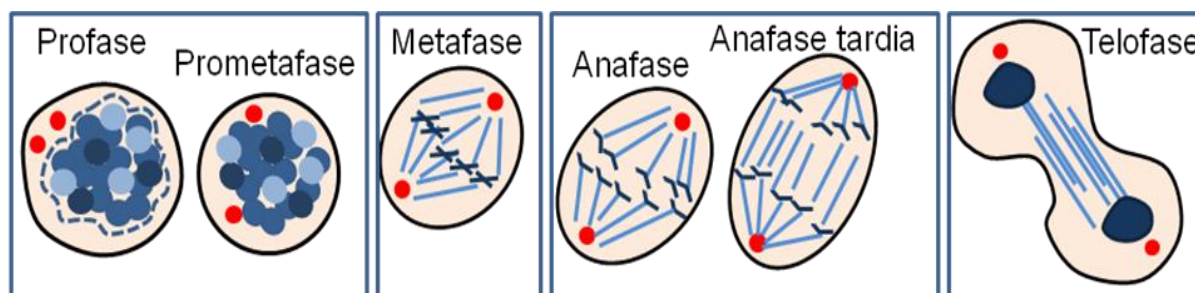


Figura 2 - Representação esquemática detalhada das etapas da Mitose – Profase, Metafase, Anafase e Telifase (Azul escuro, DNA; Azul claro, microtúbulos; Vermelho, centrossomas; Verde, Midbody; Preto, membrana plasmática) [Representação esquemática por Carolina Salteiro].

1.1.4. Citocinese

Como forma de assegurar que as células-filhas têm o mesmo conteúdo genómico da célula-mãe, é essencial que a citocinese só ocorra após a mitose.

Para que a citocinese ocorra correctamente é necessário que as células escolham o seu local de divisão. Nas células animais vai-se formar um sulco de clivagem num local definido pela posição do fuso mitótico. O local de abscisão é geralmente formado no equador da célula, na posição perpendicular ao fuso mitótico. O sulco de clivagem contém proteínas, como actina e miosina, que se vão organizar num anel contráctil de actinmiosina. À medida que o anel contrai, vai-se formar uma ponte intercelular que contém feixes densos de microtúbulos antiparalelos, os quais se vão sobrepor numa região mais densa, o *midbody* (a partir daqui denominado corpo central). A contracção do anel vai fazer com que os componentes da zona central do fuso também se concentrem no corpo central. Quando a contracção do anel é suficiente para que haja abscisão da ponte intercelular formam-se duas células filhas, fisicamente independentes e geneticamente iguais (**Revisto em Guizetti & Gerlich, 2010**). Quando a membrana citoplasmática da ponte intercelular quebra, de ambos os lados do corpo central, forma-se um corpo central completamente isolado das células filhas. Por vezes, o

corpo central é acolhido no citoplasma de uma das células filhas por autofagia, denominando-se de corpo central internalizado ou remanescente (**Revisto em Guizetti & Gerlich, 2010**)

Durante a citocinese há algumas proteínas dinâmicas que se localizam na zona central do fuso, e no corpo central. Uma dessas proteínas é a MKLP1 (*Mitotic Kinesin-like protein 1*) (**Revisto em Sagona & Stenmark, 2010**). Esta proteína é uma cinesina, essencial para o desenrolar da citocinese, que localiza no corpo central, e parece ser responsável pelo movimento dos microtúbulos antiparalelos que atravessam a ponte intercelular. Na ausência da MKLP1 as células realizam correctamente a mitose, mas falham a citocinese. A proteína MKLP1 é essencial para a correcta formação da zona mediana do fuso e do corpo central, permitindo a citocinese (**Matuliene & Kuriyama, 2002**). Para além de localizar no corpo central também fica conservada no corpo central internalizado, sendo por isso utilizada como marcador molecular deste (**Gromley et al., 2005**).

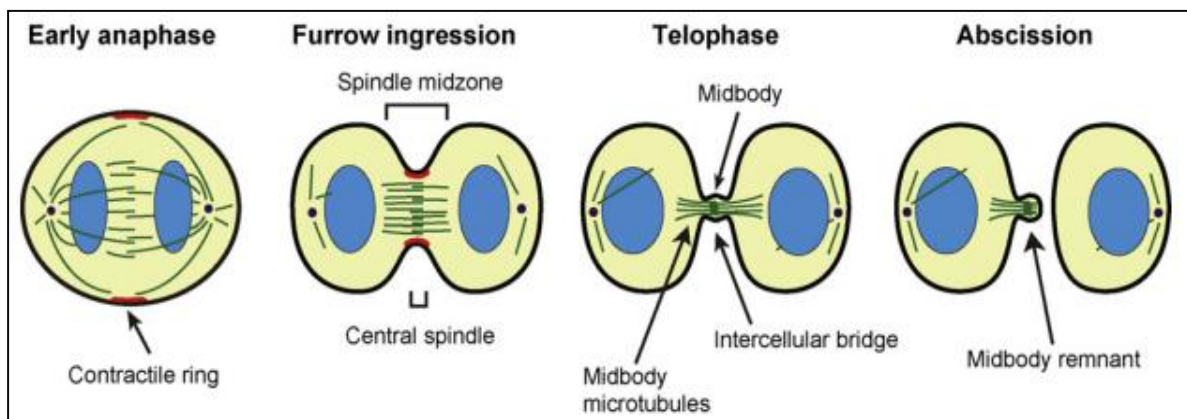


Figura 3 - Representação esquemática dos diferentes estádios da citocinese. No final da citocinese, o midbody fica remanescente numa das células filha (Microtúbulos, verde; cromatina, azul; membrana plasmática, preto; Anel contráctil de actina, vermelho; Centrossomas, roxo;) [Imagem adaptada de Guizetti & Gerlich, 2010].

1.1.5. Entrada em mitose

A entrada em mitose corresponde à transição G2 – mitose, e é caracterizada pela existência de actividade de cinases mitóticas. As CDK (CDK - *Cyclin-dependent kinases*) são uma unidade catalítica que para ser funcional está dependente de uma unidade reguladora – ciclina. Este complexo está conservado nos eucariotas. As CDK são responsáveis pela fosforilação de moléculas específicas, activando-as ou inactivando-as (**Revisto em Sagona & Stenmark, 2010**). A CDK mitótica é a CDK1 (cinase conservada no reino eucariótico) e a ciclina a ela associada, promovendo assim a entrada em mitose, é a ciclina B. A ciclina B

começa a ser sintetizada na fase S, no citoplasma, e no início da mitose é translocada para o núcleo (Clute & Pines, 1999). Assim que ocorre esta activação da cinase CDK1 pela ciclina B, a célula torna-se incapaz de impedir a sua entrada em mitose. Uma vez que é essencial para a mitose, o complexo CDK1-ciclina B também é designado por MPF (*M-phase Promoting Factor*) (Revisto em Skibbens & Hieter, 1998; Revisto em Kubiak et al., 2008). Durante a profase e a metáfase, o complexo CDK/CiclinaB vai fosforilar um grande número de proteínas, que vão ser responsáveis pelo iniciar dos eventos da mitose.

1.1.6. Saída de mitose

A progressão ao longo do ciclo celular é controlada pela acção das CDKs, activadas por ciclinas específicas, que caracterizam fases do ciclo celular. Depois do complexo CDK1/Ciclina B deixar de ser necessário, a ciclina B vai sofrer ubiquitinação e vai ser destruída por um proteassoma, permitindo à célula que saia de mitose. Gallant e Nigg (1998) verificaram que células que expressassem ciclinas mitóticas não-degradáveis sofriam um bloqueio em anafase. O APC/C (*Anaphase Promoter Complex* – ciclossoma) é uma ubiquitina ligase, constituída por várias subunidades e é activada pela fosforilação dessas subunidades por cinases tipo Polo (Cdc5, na *S. cerevisiae*). Depois de activado, o APC/C marca a ciclina B para a ubiquitinação pelo proteassoma (Revisto por J. Pines, 2011).

Em *S. cerevisiae* foi identificada uma via responsável pela saída de mitose – MEN (*Mitotic Exit Network*). A via MEN é uma cascata de cinases que se inicia durante a anafase, permitindo à célula que saia de mitose (Revisto em Enserink & Kolodner, 2010).

Em *S. pombe* foi identificado uma outra cascata de sinalização – SIN (*Septation Initiation Network*) – que embora não seja essencial para a saída de mitose, é essencial para a iniciação da contracção do anel contráctil de actinmiosina, induzindo a citocinese. Abordaremos mais pormenorizadamente estas vias, MEN e SIN, ainda neste capítulo.

1.1.7. Centrossomas no ciclo celular

Os centrossomas, figuras essenciais a todo o ciclo celular, são organelos presentes nas células eucariotas, que se dividem e se separam ao longo do ciclo celular. Na levedura, os homólogos funcionais dos centrossomas são denominados de *spindle pole bodies* (SPB). Os

centrossomas não têm membrana, não tendo por isso fronteiras definidas. A principal função dos centrossomas é de centro organizador de microtúbulos primários (MTOC), sendo também responsáveis pela polaridade da célula. **(revisto em Schatten, 2008).**

O centrossoma de células de mamífero é constituído por dois centríolos orientados perpendicularmente um em relação ao outro. À volta dos centríolos vai haver acumulação de proteínas, formando o material pericentriolar (PCM) **(Revisto em Delaval e Doxsey, 2009)**. O PCM contém um grande número de proteínas centrossomais – proteínas que estão envolvidas directamente na realização de funções específicas dos centrossomas – algumas permanentemente associadas à estrutura central do centrossoma – como por exemplo a γ -tubulina – e outras com uma associação temporária. **(Revisto em Schatten, 2008).**

Ao longo do ciclo celular, a duplicação e divisão dos centrossomas está intimamente sincronizada com a duplicação e divisão do DNA. O processo de duplicação dos centrossomas começa com desorientação do par de centríolos, duplicação dos centríolos, separação dos centrossomas e resulta na separação dos centrossomas irmãos **(revisto em Schatten, 2008)**.

O centrossoma interfásico está associado ao núcleo. Na transição G2/mitose, os centrossomas sofrem uma reorganização. Os centrossomas mitóticos vão ser responsáveis pela organização do fuso mitótico e pela regulação do equilíbrio bipolar na separação dos cromossomas. **(Revisto em Schatten, 2008).**

1.2. Mob

1.1.1. A proteína Mob1 foi inicialmente descrita em 1998 por Luca e Winey, em *Saccharomyces cerevisiae*. O gene que codifica a proteína Mob1 é membro de uma grande família conservada de genes, cujos membros estão distribuídos pelos eucariotas. O número de genes Mob varia consoante os organismos, desde a *Tetrahymena thermophila* que só contém um gene Mob – Mob1 – ao humano que tem 7 genes Mob **(Florindo & Tavares, Human Genome Data Base, direct submission, 2003)**. O facto de o número de genes Mob ser mais elevado em eucariotas superiores pode indicar uma especialização de funções ao longo da evolução.

1.2.1. Os Mob2 em diferentes organismos

1.2.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

O MPS1 é um gene essencial da levedura que codifica para uma cinase – Mps1p – que tem duas importantes funções relacionadas com a estabilidade genómica: é necessária para a duplicação dos SPB e codifica para a regulação da transição metafase-anáfase (**Winey et al., 1991**). A proteína Mob1 foi identificada como um substrato da Mps1p, daí o seu nome Mob – *Mps One Binder* (**Luca e Winey, 1998**). No entanto, esta interacção entre as proteínas Mob1p e Mps1p não foi encontrada noutros organismos.

Em *S. cerevisiae*, Luca e Winey (1998) mostraram que nos mutantes Mob1 as células ficavam mitoticamente bloqueadas na anáfase tardia. Em 2001, Luca et al. descobriram que outros mutantes Mob1 conseguiam progredir na mitose mas não conseguiam finalizar a citocinese. Em *S. cerevisiae* foi identificado o processo de saída de mitose MEN que regula a coordenação temporal da mitose. Esta cascata de cinases, que se inicia durante a anáfase, é iniciada pela GTPase Temp1, activando a Dbf2, uma cinase necessária para a finalização da mitose (**Komarnitsky, 1998**). A cinase Dbf2, quando ligada ao Mob1, activa a fosfatase Cdc14. Esta vai bloquear a actividade das CDK, permitindo à célula que saia da anáfase tardia em que se encontra (**Bardin et al., 2000**). Concluiu-se então que o gene Mob1 é essencial para que a célula consiga sair da mitose e para que a ploidia celular seja mantida (**Luca e Winey, 1998**).

Luca e Winey (1998) também descobriram outra proteína do tipo Mob – o Mob2. Mais tarde, **Weiss et al. (2002)** descobriram que o Mob2, embora não seja uma proteína essencial para a viabilidade celular da levedura, também actua como regulador da actividade de cinases, demonstrando funções na polaridade da célula.

1.2.1.2. *Schizosaccharomyces pombe*

Em *S. pombe*, foi identificado uma cascata de sinalização semelhante ao da *S. cerevisiae*, embora este fosse responsável pelo início da citocinese. Esta cascata de sinais SIN é responsável pela separação física da célula. Também se inicia com uma GTPase – Spg1 – localizada nos pólos do fuso durante a anáfase. A Spg1 desencadeia uma cascata de cinases,

que termina com a activação do complexo Sid2-Mob1, provocando a iniciação da contracção do anel contráctil e a formação da divisão do septo, sendo assim responsável pela citocinese. Em *S. pombe* o Mob1 é necessário para que a célula inicie a citocinese, e em *S. cerevisiae* o Mob1 é essencial para que seja possível a célula sair de mitose. Em ambos os organismos, embora através de processos diferentes, o Mob1 está envolvido no final da divisão celular, sendo necessário para que a célula progrida ao longo do ciclo.

1.2.1.3. *Tetrahymena thermophila*

A *Tetrahymena thermophila* é um protozoário unicelular polarizado, com divisão simétrica, que contem um único gene do tipo Mob – TtMob1. Ao se fazer a depleção do gene TtMob1 neste organismo verificou-se uma anormal polaridade celular e a não-abcissão da célula, não ocorrendo citocinese (**Tavares et al., 2011, não publicado**), revelando-se assim o Mob1 um gene responsável pela polaridade celular e envolvido na abcissão celular no final da divisão citoplasmática (**Tavares et al., 2011, não publicado**).

1.2.1.4. *Trypanosoma brucei*

O protozoário hemoflagelado *Trypanosoma brucei* foi utilizado como modelo no estudo do ciclo celular. A divisão no *T. brucei* é regulada pela acção de cinases dependentes de ciclinas. Neste organismo foram identificados dois genes Mob4, e quando induzia a baixa expressão de Mob4 *T. brucei.*, observou-se que havia um atraso na citocinese (**Hammarton, 2005**). Os autores concluíram que o Mob4 é necessário para que a citocinese ocorra de forma precisa e com a sincronização correcta (**Hammarton, 2005**).

1.2.1.5. *Drosophila melanogaster*

O genoma da *Drosophila melanogaster* codifica para quatro genes homólogos ao gene Mob1 da levedura – dMob1, dMob2, dMob3 e dMob4 (também designado por MATS). Os genes dMob1, dMob2 e dMob4 são todos essenciais, sendo a sua depleção letal (**Revisto em Chow, 2010**).

Quando a expressão do gene dMob1 é diminuída, verifica-se que os machos deixam de ser férteis (**Samora, 2007**). A diminuição da expressão do gene dMob2 provoca a formação de tumores na fase larvar e o bloqueio da transição metafase-anafase (**Samora, 2007**).

O gene hMob4 activa o supressor de tumores LATS/Warts (cinase homóloga da Dbf2/Dbf20, em levedura). A sua sobreexpressão inibe o crescimento celular, ao passo que a baixa expressão proteica deste gene induz o desenvolvimento de tumores na fase adulta das moscas (**Zhi-Chun et al., 2005**) (**Domingues & Tavares, 2005**).

1.2.1.6. *Homo sapiens*

Nos humanos, *Homo sapiens*, foram até agora descritos 7 genes do tipo Mob – hsMob1, hsMob2, hsMob3A/3B/3C, hsMob4A/4B (**Florindo & Tavares, Human Genome Data Base, direct submission, 2003**).

1.2.1.6.1. hsMob1

O homólogo da proteína hsMob1 foi descoberto inicialmente em neurónios de ratinhos (mMob1 ou Phocein) por interagir com a proteína striatin (**Baillat 2001**). As proteínas striatin e SG2NA (*S/G2 nuclear autoantigen*) são proteínas que pertencem à família Striadin. Uma das características desta família é que cada membro tem vários domínios de interacção proteína-proteína. Ambas as proteínas se associam à fosfatase 2A (PP2A), e ambas têm um domínio responsável pela ligação à calmodulina (**Moreno et al., 2001**). A striatin e a SG2NA encontram-se em maior concentração no cérebro, nas dendrites neuronais (**Moreno et al., 2001**). A striatin é uma proteína intracelular neuronal expressa nos compartimentos dendríticos, utilizada como um marcador da polaridade neuronal (**Baillat, 2001**).

A diminuição da expressão da striatin resulta, *in vivo*, na diminuição da actividade locomotora e, *in vitro*, na redução do crescimento das dendrites (**Bartolli et. al., 1999**). Baillat et al. (2001) verificou, em células HeLa, que a proteína hsMob1 interage com a proteína SG2NA, e que ambas as proteínas estão localizadas no complexo de Golgi. Tanto a SG2NA como a Striatin existem em complexos com a fosfatase PP2A, nos quais se identificou a proteína mMob1 (**Baillat, 2001**). A PP2A regula as proteínas mMob1, striatin e

SG2NA, sendo responsável por mudanças no citoesqueleto e interações entre o citoesqueleto e a membrana citoplasmática.

Em células humanas, quando observada a diminuição de expressão de Mob1, verificou-se que há defeitos na formação do fuso mitótico e no alinhamento dos cromossomas, sugerindo um papel na segregação dos cromossomas (**Amaral, 2010**).

1.2.1.6.2. hsMob4

Em *Drosophila melanogaster* há uma via responsável pela supressão tumoral – a via Hippo-LATS (Edgar, 2006). Esta via de sinalização regula a coordenação da apoptose e a proliferação celular (**Revisto em Vitulo et al., 2007**). Todos os componentes da via Hippo-LATS têm homólogos em mamíferos. Nesta via, o dMob4 (também denominado por Mats, que se liga ao Warts, homólogo de LATS1) (**Edgar, 2006**) é o homólogo do hsMob4. Isto sugere que as proteínas hsMob4 tenham uma função de supressão de tumores (**Chow et al., 2010**).

A família NDR (*nuclear Dbf2-related*) é constituída em mamíferos pelas cinases LATS1 (large tumor suppressor), LATS2, NDR1, e NDR2 (**Hergovich et al., 2006**). As LATS são proteínas supressoras de tumores. Quando os níveis celulares de hsMob4A ou LATS diminuem, ocorrem defeitos na saída de mitose (**Bothos et al., 2005**).

hsMob4A liga-se às cinases NDR, e quando hsMob4 é fosforilada, pelo MST1/2 (homólogo de Hippo em mamíferos), vai haver fosforilação das NDR. As NDR estão localizadas no citoplasma, associadas aos centrossomas e à membrana citoplasmática, sendo essenciais para a separação dos centrossomas (**Hergovich et al., 2005**).

Hergovich et al. (2005) verificou que, em células humanas, a proteína hsMob4 vai activar as cinases NDR. Ao se induzir a associação do hsMob4A/B ao LATS1, há uma activação da cinase LATS1 (**Hergovich et al., 2006**). LATS1 tem um motivo conservado, e é através deste que se liga à hsMob4. Este motivo, através do qual a actividade da cinase é regulada, também está conservado nas cinases NDR1/2 e LATS2 (**Hergovich et al., 2006**), que provavelmente também interagem com o hsMob4.

Lai et al. (2005) observou que a expressão de hsMob4A em moscas, cujo gene dMob4 tinha sido depletado, suprime a formação de tumores, substituindo a função do seu gene homólogo de *Drosophila*. Estes dados indicam que as funções do gene hsMob4 foram conservadas ao longo da evolução, deixando fortes pistas sobre a função deste gene.

Florindo (2004) verificou que a proteína codificada pelo gene *hsMob4* está localizada nos centrossomas e no corpo central. Quando se induz a diminuição da expressão da proteína *hsMob4*, o fenótipo mais evidente é a não-finalização da citocinese por parte das células, devido à não abscisão da ponte intercelular. Desta forma, as células mantêm-se ligadas por longas pontes intercelulares, podendo originar ou células binucleadas, ou ruptura da ponte intercelular, devido à força exercida nesta. A ausência de *hsMob4* também provoca mobilidade celular, e aumenta a estabilidade dos microtúbulos (**Florindo, 2004**). A autora concluiu que, embora não seja necessário para que as células consigam sair de mitose nem para reentrarem na interfase, o *hsMob4* é necessário para que ocorra a abscisão durante a citocinese (**Florindo, 2004**). A sobreexpressão do *hsMob4* mostrou-se tóxica para as células, conduzindo a um aumento de morte celular, a um bloqueio em metáfase e ao colapso dos fusos mitóticos (**Florindo, 2004**).

1.2.1.6.3. *hsMob2*

Existem poucos estudos sobre os genes *hsMob2* e *hsMob3*. Uma vez que a família *Mob* aparenta estar relacionada com a progressão do ciclo celular, foram feitos estudos no nosso laboratório de modo a contribuir para a caracterização da família de genes *Mob* ao longo da divisão celular, os quais permitiram a obtenção de resultados preliminares relativos ao *hsMob2*.

Estes resultados mostraram que em células humanas em profase (**Figura 4**), após a depleção de *hsMob2* há duas vezes mais células cujos centrossomas falham a separação do que no controlo (**Florindo & Tavares, Resultados não-publicados**).

Uma vez observadas células num estado um pouco mais avançado, em prometáfase (**Figura 5**), cerca de 80% das células que sofreram a depleção do *hsMob2* tinham defeitos no fuso mitótico, aparentando serem monopolares (**Florindo & Tavares, Resultados não-publicados**). Também se comparou a intensidade da γ -tubulina das células com baixa expressão de *Mob2* com o controlo (**Figura 6**), e verificou-se que a intensidade era mais fraca nas células sem *Mob2*, e que a γ -tubulina não estava localizada nos centrossomas. Será que a γ -tubulina se dissipou dos centrossomas para a célula, ou será que a sua concentração diminuiu?

Uma vez que há uma forte evidência de que a ausência de expressão de hsMob2 provoca problemas na separação dos centrossomas, estes resultados permitem-nos especular duas hipóteses: ou a ausência de hsMob2 faz com que os centrossomas nunca se separem, ou há separação dos centrossomas, seguido de um colapso (**Figura 7**). Em ambos os casos, prevê-se que o fuso mitótico não se organize correctamente, tendo por isso um aspecto monopolar.

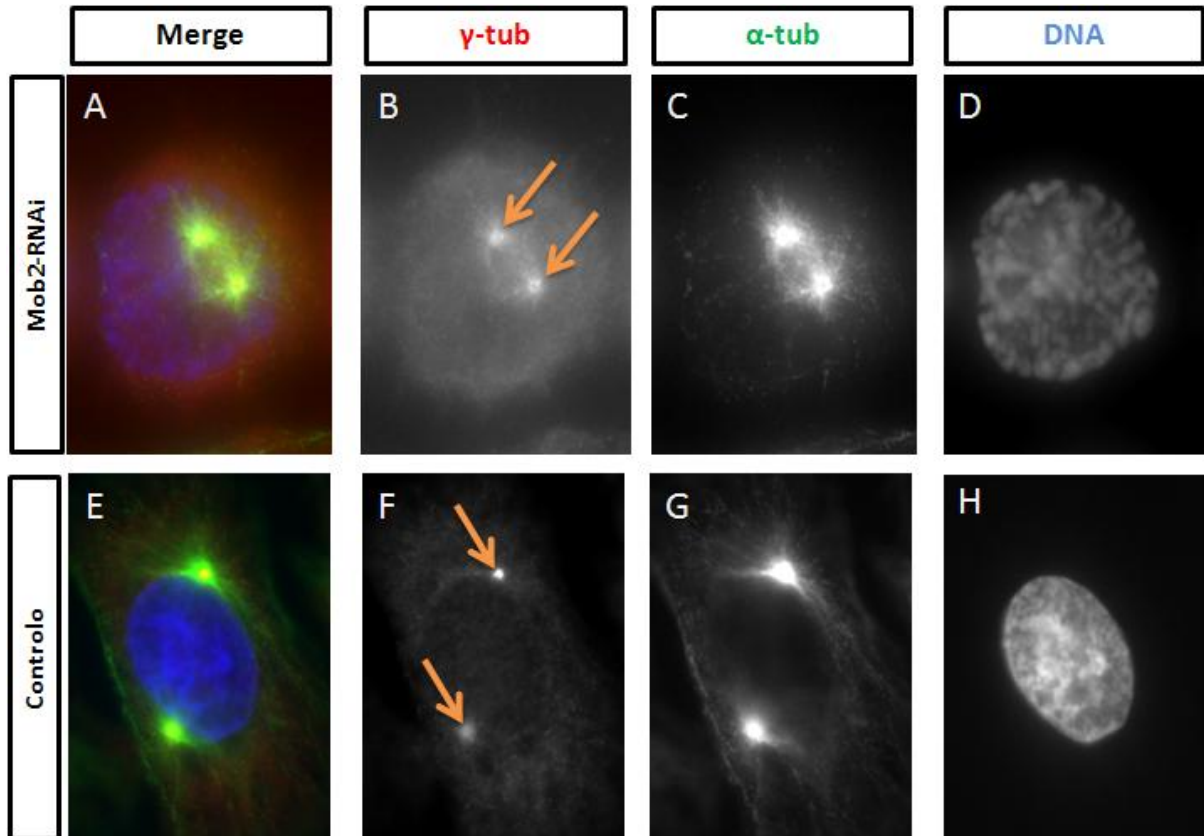


Figura 4 - Imunofluorescência de células HeLa em profase com Mob2RNAi (microscopia de imunofluorescência). Imunolocalização da γ -tubulina (vermelho) e da α -tubulina (verde) em células humanas em profase transfectadas com Mob2RNAi (A – D) e no controlo (E – H) (resultados preliminares por Cláudia Florindo). Após a inibição da produção da proteína Mob2, há falha na separação dos centrossomas (B,C), ao contrário do que acontece no controlo (F, G). As células sem expressão de Mob2 têm 2 vezes mais defeitos na separação dos centrossomas do que o controlo.

Será que o hsMob2 é responsável pela separação dos centrossomas? Será que a expressão diminuída do hsMob2 provoca a dispersão da tubulina dos microtúbulos para o citoplasma?

Os humanos têm 7 genes do tipo Mob: Será que o conjunto dos 7 Mobs representa uma especialização das funções celulares do Mob?

Uma vez que pouco se sabe sobre o gene hsMob2, surgiu a necessidade de perceber a sua função.

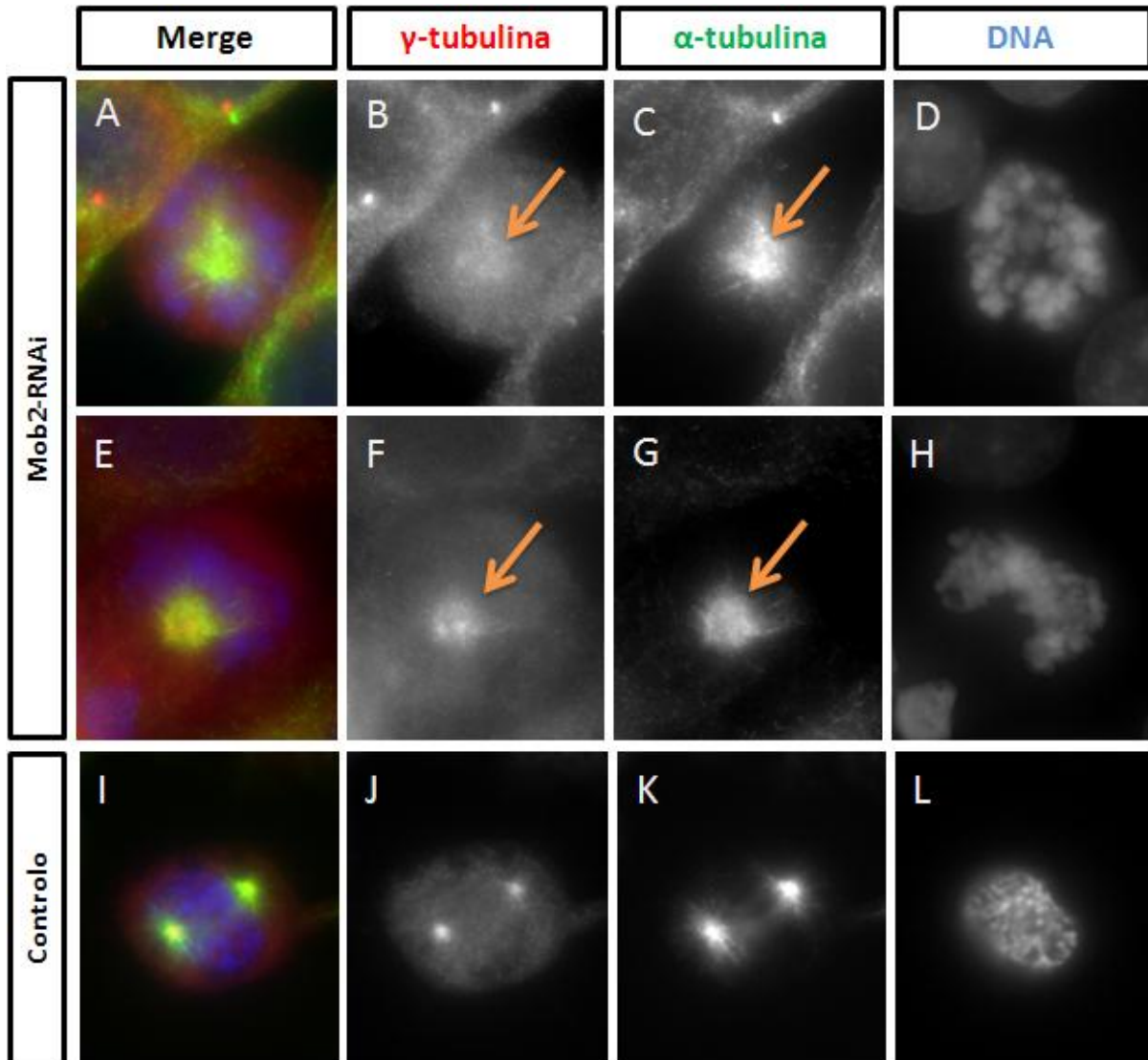


Figura 5 - Imunofluorescência de células HeLa em pró-metáfase com Mob2RNAi (microscopia de imunofluorescência). Imunolocalização da γ -tubulina (vermelho) e da α -tubulina (verde) em células humanas em pro-metáfase transfectadas com Mob2RNAi (A – H) e no controlo (I – L) (resultados preliminares por Cláudia Florindo). Após a inibição da produção da proteína Mob2, os centrosomas não separam e a maioria das células tem defeitos no fuso (os fusos parecem mono-polares), ao contrário do que acontece no controlo (I – L) no qual se observam os centrosomas separados e o fuso bipolar formado.

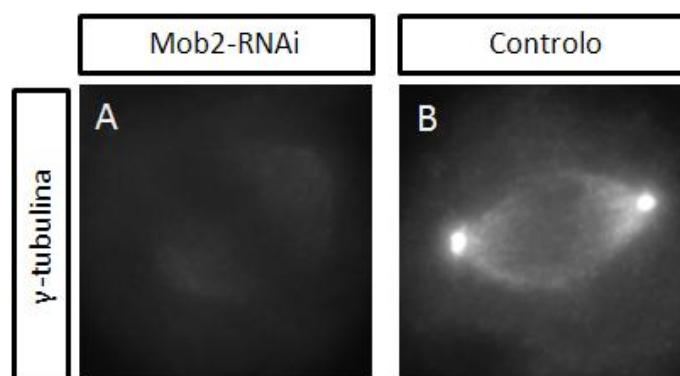


Figura 6 – Imunofluorescência de células HeLa com Mob2RNAi e imunolocalização da γ -tubulina (microscopia de imunofluorescência). Imunolocalização da γ -tubulina em células com Mob2RNAi (A) e no controlo (B). (dados preliminares por Cláudia Florindo) A intensidade da γ -tubulina é mais fraca em células com pouca expressão de Mob2 (Mob2RNAi) do que no controlo. γ -tubulina não está localizada nos centrosomas. Fotografias tiradas com a mesma intensidade.

Assim, o objectivo deste trabalho foi determinar a função do gene *hsMob2*, tendo sido o primeiro passo a descoberta da localização da proteína codificada pelo gene *hsMob2*, em células humanas.

Tendo em conta as evidências de trabalhos anteriores, quis-se perceber se o gene *hsMob2* está de alguma forma relacionado com problemas nos centróssomas, mais concretamente na separação dos centróssomas ou no colapso destes.

Deste modo, pretendeu-se determinar a localização intracelular da proteína *hsMob2* ao longo do ciclo celular, utilizando técnicas de imunofluorescência e fluorescência com a proteína de fusão *hsMob2*-GFP.

Com o objectivo de mais tarde purificar os soros policloniais existentes decidiu-se clonar o gene *hsMob2* no vector pENTR4, tendo em vista a produção em grande escala da proteína *hsMob2*.

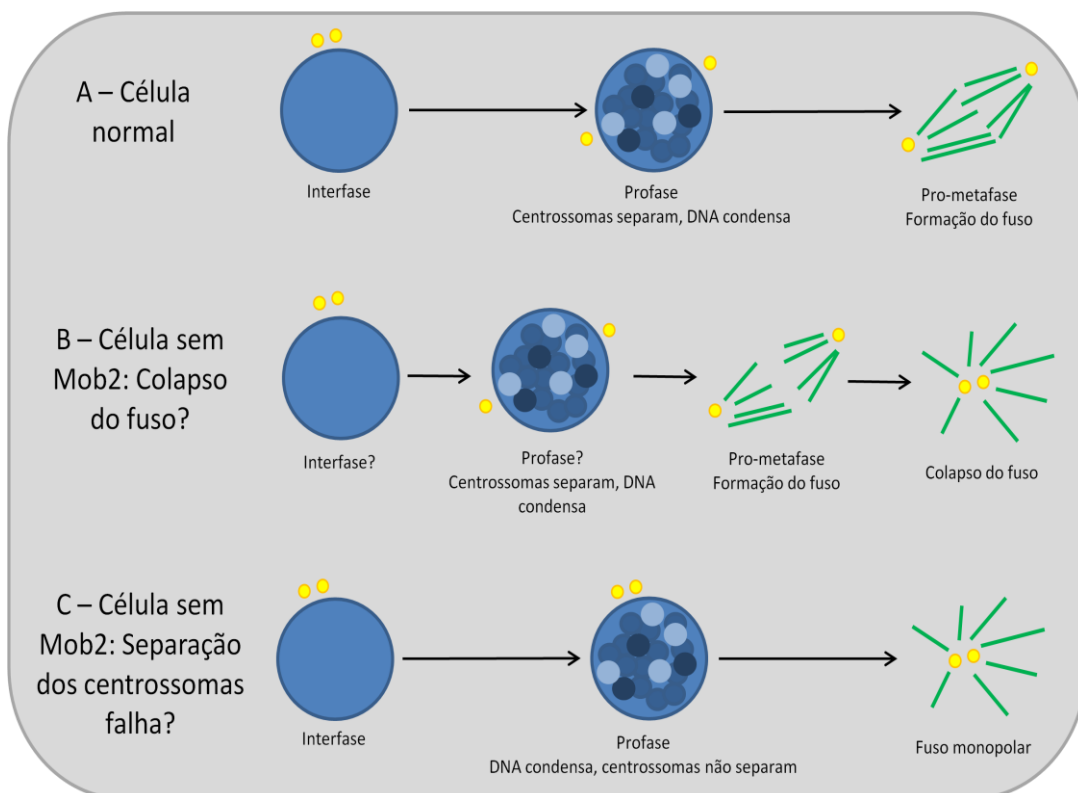


Figura 7 - A – Representação esquemática da correcta separação dos centróssomas, desde a fase G1 até à prometafase. B e C – Hipóteses colocadas sobre a separação dos centróssomas em células sem expressão de Mob2: Colapso do fuso mitótico (B) Vs Falha na separação dos centróssomas (C). DNA, Azul; Centróssomas, Amarelo; Microtúbulos, Verde; [Representação esquemática por Carolina Salteiro].

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Estirpe bacteriana:

A estirpe bacteriana utilizada na realização deste trabalho foi a bactéria *Escherichia coli*, DH5 α .

Genótipo da estirpe de *Escherichia coli* utilizada:

DH5 α – supE44 delta-lacU169(phi80lacZ) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 (Sambrook, 2001).

Linha celular:

Na realização deste trabalho foram utilizadas linhas celulares de mamíferos (células HeLa). Estas foram mantidas em cultura em atmosfera húmida a 37°C, com 5% de CO₂, cresceram em meio Advanced DMEN, suplementado com 4% Soro fetal bovino e 1% glutamina.

2.2. Manipulação de células de Mamíferos

2.2.1. Semear células em placas

As células foram tripsinizadas e resuspensas em meio. Contaram-se 1,6 x 10⁵ células/ml (placas de 6 poços), 0,7 x 10⁵ células/mL (placas de 12 poços) e 0,35 x 10⁵ células/mL (placas de 24 poços). A cada poço foi adicionado meio (2 ml, 1ml e 0,5 ml, respectivamente). De seguida adicionou-se 0,5mL de células, na concentração necessária. Pôs-se a incubar a 37°C.

2.2.2. Preparação de lamelas com poli-L-lisina

Cobriu-se a lamela com poli-L-lisina 0,01% (w/V) (temperatura ambiente). Esperou-se 5 minutos, tirou-se polielisina e lavou-se 5 vezes com H₂O deslitala. Esperou-se no mínimo 2 horas e semearam-se as células.

2.2.3. Sincronização de células

Sincronizaram-se as células HeLa na fase S por incubação com 2mM de Timidina. 24 horas depois desbloquearam-se as células, trocando o meio por meio novo. Esperou-se 4 a 6 horas, e fixaram-se as células.

2.2.4. Transfecções de DNA plasmídico em células HeLa

Para transfectar células HeLa com DNA plasmídeo, usou-se a Lipofectaminatm2000 (Invitrogene) como reagente de transfecção. Para placas de 6, 12 e 24 poços semearam-se no dia anterior $1,6 \times 10^5$ células/mL, $0,7 \times 10^5$ células/mL e $0,35 \times 10^5$ células/mL, respectivamente. No dia seguinte fez-se a transfecção, utilizando-se 1µl de reagente de transfecção e 1µg de DNA. Duas horas e meia após a transfecção aspirou-se o meio e adicionou-se meio novo, com soro. 24 horas depois da transfecção as células foram fixadas para imunofluorescência ou recolhidas para extracto de western-blot.

2.2.5. Imunofluorescência

Semearam-se $0,7 \times 10^5$ células/mL sobre lamelas, em placas de 12 ou 24 poços. No dia seguinte, antes da fixação, as células foram sujeitas a três lavagens rápidas com PBS aquecido a 37°C. Utilizaram-se diferentes métodos de fixação, que se apresentam em seguida.

2.2.5.1. Fixação com Metanol/Acetona

A solução metanol/acetona preparada no próprio dia foi refrigerada a -20°C , antes da fixação. Lavou-se as células 1 vez com tampão PEM (10mM PIPES, 2mM MgCl_2 e 5 mM EGTA; pH 6,8 ajustado com NaOH), pré-aquecido a 37°C . Para fixar as células, adicionou-se a solução metanol/acetona às células, e incubou-se à temperatura ambiente durante 2 minutos. Após a fixação, lavaram-se as células 3 vezes com PBS (5 minutos). De seguida, permeabilizaram-se as células com 0,5% Triton-PBS (10 minutos, temperatura ambiente). Lavaram-se as células 3 vezes com PBS, (5 minutos), seguida de uma lavagem com PBS-TW 0,05% (5 minutos). Incubou-se com anticorpo primário (30min + 30min numa câmara húmida) diluído com ADB (*solução de diluição de anticorpos* – 1% FCS + 0,05% de Tween20, em PBS). Lavou-se 3 vezes com PBS (5 minutos), seguido de uma lavagem com PBS-TW (5 minutos). Incubou-se com anticorpo secundário, em ADB (30 minutos, câmara escura húmida). Lavou-se 3 vezes com PBS (5 minutos), seguindo-se uma lavagem com PBS-TW (5 minutos). Corou-se com DAPI ($1\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (10 minutos, temperatura ambiente). Lavou-se 3 vezes com PBS. Montou-se a lâmina em mowiol, e após uma hora de secagem, selou-se a preparação com verniz transparente (Nivea).

Preparação do Mowiol: O Mowiol foi preparado no laboratório diluindo 2,4g de Mowiol em 6ml de glicerol, a solução foi misturada por agitação lenta, seguida de adição de 6 ml de água e agitou-se durante a noite. No dia seguinte juntaram-se 12 ml de tampão Tris pH 7.4 (a uma concentração de 0,2M) e aqueceu-se a 50°C mantendo uma agitação suave durante aproximadamente 10 minutos. Após a dissolução do Mowiol, centrifugou-se a solução a 5000 g durante 15 minutos. Adicionou-se DABCO (Sigma) para uma concentração final de 2,4%. A solução foi aliqotada e congelada. Uma vez descongelada guardou-se a 4°C .

Nestes ensaios utilizaram-se como anticorpos primários o soro anti-hsMob2 (diluído a 1/100), o anti γ -tubulina (diluído a 1/250), o anti β -tubulina (diluído a 1/250) e o MKLP-1 (diluído a 1/1000). Utilizaram-se como anticorpos secundários os anticorpos Alexa 488 goat anti-rabbit e goat anti-mouse e os anticorpos Alexa 594 goat anti-rabbit e goat anti-mouse, todos diluídos a 1/500.

2.2.5.2. Fixação com Metanol/Acetona e PEM-Glicerol

Lavaram-se as células 1 vez com tampão PEM-glicerol 30%, pré-aquecido a 37°C. Fixaram-se as células HeLa numa solução de Metanol/Acetona (1:1), e deixou-se à temperatura ambiente (2 minutos). Lavou-se 3 vezes, 5 minutos cada, com PBS. O resto do protocolo foi realizado de forma semelhante ao descrito para a fixação com metanol/acetona.

2.2.5.3. Fixação com Paraformaldeído

A fixação com Paraformaldeído (PFA) foi feita com uma solução de PFA a 3,7% [0,74g PFA + 10ml H₂O + 225µl NaOH 1,85M, para um volume final de 20 ml], diluída em tampão PEM e aquecida a 37°C antes de ser adicionada às células). Lavaram-se as células 1 vez com tampão PEM-glicerol, pré-aquecido a 37°C. Fixaram-se células HeLa com a solução de PFA e deixou-se à temperatura ambiente (10 minutos). Lavou-se 3 vezes com PBS (5 minutos cada lavagem). Após a fixação o protocolo foi realizado de forma semelhante ao descrito para a fixação com metanol/acetona.

2.3. Manipulação de proteínas

2.3.1. Recolha de células

Aspirou-se o meio dos poços, lavaram-se as células com PBS frio e aspirou-se. Adicionou-se 500µl de PBS a cada poço. Raspam-se as células e pipetou-se para um eppendorf. Adicionou-se 200µl de PBS a cada poço, e voltou-se a raspar e a pipetar para o eppendorf. Centrifugou-se (5 minutos, 2000 g). Retirou-se o sobrenadante, e congelou-se o pellet.

2.3.2. Géis de proteínas e Western Blots

2.3.2.1. Preparação das amostras

Usaram-se as células recolhidas. Adicionou-se tampão Laemmli 2x concentrado (100mM trisHCl pH8, 4% SDS, 0,2% de azul de bromofenol, 20% glicerol, 200mM de β -mercaptoetanol) a cada tubo com o extracto celular total recolhido anteriormente. Resuspendeu-se e pôs-se em gelo (5 minutos). Colocaram-se os tubos num banho seco a 100°C (5 minutos) e centrifugou-se 5 segundos. A seguir carregou-se o gel.

2.3.2.2. Gel de proteínas (SDS-PAGE)

Os géis de proteínas foram preparados de acordo com o descrito em Sambrook & Russel, 2001. Usou-se uma solução de 30% de acrilamida/Bis acrilamida (BioRad). Os géis foram corridos no sistema Mini-PROTEAN III (BioRad), em tampão de corrida 1x (25mM Tris, 0,192M Glicina, 0,1% de SDS, pH 8,3). Aplicou-se uma corrente eléctrica de 15mA enquanto as amostras se encontravam no gel de concentração. Uma vez no gel de separação, duplicou-se o valor da corrente eléctrica (30mA). Como marcador de peso molecular usou-se o Pre-stained protein Ladder Plus (Fermentas, #SM1811). Os géis de proteínas foram, ou corados com Coomassie durante 2horas (0,25 azul brilhante coomassie (BioRad), 45% Metanol e 10% de Ácido Acético Glacial), seguidos de descoloração (40% Metanol, 10% Ácido Acético Glacial), ou transferidos por electroforese para membranas de PVDF para realização de Western-Blot.

2.3.2.3. Western-blot

Submergiu-se a membrana de PVDF em metanol durante 1minuto. Depois colocou-se a membrana em água destilada (5 minutos) e de seguida em tampão de transferência (tempo mínimo de 5 minutos), sempre em agitação lenta e constante. Ao mesmo tempo, colocou-se o gel em tampão de transferência durante 5-10 minutos. O gel e a membrana foram colocados numa cassete, pela seguinte ordem: Uma esponja, 3 folhas de papel Whatman 3MM, o gel

SDS-PAGE, a membrana de PVDF, três folhas de papel Whatman 3MM e uma esponja. As proteínas foram transferidas para a membrana durante 1 hora, com uma voltagem de 220 milIA. Após a transferência bloquearam-se as membranas (TBS, 0,1% Tween, 10% leite magro (em pó, Molico) durante 1 hora, com agitação, à temperatura ambiente. Lavou-se a membrana com TBS, 0,1% Tween, 1% leite magro, durante 5 minutos, e incubou-se com o anticorpo primário, durante 1 hora, em agitação e à temperatura ambiente. Os anticorpos primários foram diluídos em TBS, 0,1% Tween, 1% leite magro, num volume final de 1mL. De seguida lavou-se a membrana 3 vezes (5 minutos) com TBS, 0,1% Tween, 1% leite magro, e incubou-se a membrana com o anticorpo secundário, durante uma hora, com agitação e à temperatura ambiente. Também os anticorpos secundários foram diluídos em TBS, 0,1% Tween, 1% leite magro. Depois da incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS, 0,1% Tween, 1% leite magro, seguida de uma lavagem com TBS. O sinal foi detectado utilizando uma mistura 50/50 das soluções de ECL (solução I – 20mL 1M Tris pH 8,5, 2mL luminol, 889µl p-coumaric acid, 178 mL H₂O e solução II – 20mL 1M Tris pH 8,5, 180 mL H₂O, 123 µl 30% H₂O₂). Utilizou-se o filme Hyperfilm ECL (Amersham) para a exposição. A revelação do filme foi feita usando o revelador Kodak. Utilizaram-se os anticorpos primários ACR40 (coelho, 1:100), ACR41 (coelho, 1:100), anti-GFP 3E1 (ratinho, 1:250), anti-γtubulina (1:100), lâmina (1:100) e os anticorpos secundários HRP anti-IgG de coelho (1:4000) e HRP anti-IgG de ratinho (1:2000), consoante os anticorpos primários utilizados, conjugados com a peroxidase HRP.

2.3.2.4. Stripping da Membrana de Western Blot

2.3.2.4.1. com Glicina

Colocaram-se as membranas em solução de glicina (1,5g Glicina, 100 µl SDS 10%, em TBS, para um volume final de 100 ml) durante 1 hora. Fizeram-se 3 lavagens com TBS, e re-bloquearam-se as membranas com TBS, 0,1% Tween, 10% leite magro.

2.3.2.4.2. com β-Mercaptoetanol

Cobriu-se a membrana com tampão de stripping, 50mL (400µl de β-Mercaptoetanol, 1ml de SDS 10%, 3,125ml Tris 1M pH 6,8, em H₂O, para um volume final de 50ml), durante 30 minutos, a 60°C. Lavou-se membrana com TBS-Tween 0,1%, e re-bloqueou-se com TBS, 0,1% Tween, 10% leite magro.

2.3.2.5. Quantificação da intensidade das bandas dos Western Blots.

A intensidade das bandas dos Wertern Blots foi quantificada por um método qualitativo baseado na intensidade relativa das bandas.

2.4. A técnica de RNAi

2.4.1. Oligonucleotídeos de siRNA utilizados na técnica de RNAi

Nome	Sequência	RNA alvo
Oli3	CUG GAC UUC CAG AAG AAC AUC dT dT	Lam A/C (Elbashir et al., 2001)
CY3		Controlo negativo – A sequência alvo não existe no genoma humano. Ambion® (Nº catálogo AM4621)
Scamble duplex	GCG CGC UUU GUA GGA UUC G dT dT	Controlo negativo – A sequência alvo não existe no genoma humano. Ambion®
Mob2RNAi	GGA GAG ACG UGU CAG ACG A dT dT	hsMob2 – HCCA2

Tabela 1 - Oligonucleotídeos de siRNA utilizados na técnica de RNAi

2.4.2. Transfecção do duplex de RNAi para Western-Blot

Usou-se a lipofectaminata2000TM (Invitrogen) como reagente de transfecção, para se transfectar as células HeLa com RNAi. No dia anterior à transfecção (dia -1), semearam-se 0.3×10^5 células/mL em placas de 24 poços. No dia da transfecção (dia 0) transfectaram-se as células com os oligos de RNAi, usando 1µl de reagente de transfecção e 1 µg de oligo. Duas horas e meia depois trocou-se o meio por meio novo com soro. No dia seguinte (dia 1) transfectaram-se as células com DNA – Mob2GFP e GFP – usando 1µl de reagente de transfecção e 1 µg de oligo. Duas horas e meia depois trocou-se o meio por meio novo com soro. No 2º dia pós-transfecção (dia 2) fez-se o split das células (1:3), a seguir ao qual se esperou 4 a 6 horas. Depois re-transfectaram-se as células com os oligos de RNAi ou recolheram-se as células, consoante os poços. No dia 3 recolheram-se algumas células, e no

dia 4 recolheram-se as restantes. As células foram identificadas de 2 d.p.t., 3 d.p.t. e 4 d.p.t. consoante o “dia pós-transfecção” no qual foram recolhidas.

2.4.3. Transfecção do duplex de RNAi para imunofluorescência

Para se transfectarem as células HeLa com RNAi, usou-se a lipofectaminatm2000 (Invitrogen) como reagente de transfecção. No dia anterior à transfecção, semearam-se 0.3×10^5 células/mL em placas de 24 poços, sobre lamelas de 12mm, tratadas com polielisina. No dia da transfecção transfectaram-se as células com os oligos de RNAi, usando 1 μ l de reagente de transfecção e 1 μ g de oligo. Duas horas e meia depois trocou-se o meio por meio novo com soro. No dia seguinte fixaram-se as células e fez-se imunofluorescência, incubando as células com tubulina e DAPI.

2.5. Anticorpos e vectores

2.5.1. Anticorpos primários

Designação	Anti-	Feito em:	Companhia:
GTU88	γ -tubulina	Monoclonal ratinho	Sigma
Tub2.1	β -tubulina	Monoclonal ratinho	Sigma
ACR40	hsMob2	Policlonal coelho	Não comercial
ACR41	hsMob2	Policlonal coelho	Não comercial
3E1	GFP	Monoclonal ratinho	CRCUK
MKLP-1	MKLP-1	Policlonal coelho	Abcam
Lam A/C (SC-7792)	Lamina A/C	Monoclonal ratinho	Santa Cruz

Tabela 2 - Anticorpos primários utilizados.

2.5.2. Anticorpos secundários

Designação	Anti-	Feito em:	Companhia:
Alexa 488	Coelho	Cabra	Molecular probes
Alexa 488	Ratinho	Cabra	Molecular probes
Alexa 594	Coelho	Cabra	Molecular probes
Alexa 594	Ratinho	Cabra	Molecular probes
HRP	Coelho	Cabra	Jackson ImmunnoResearch
HRP	Ratinho	Cabra	Jackson ImmunnoResearch

Tabela 3 - Anticorpos secundários utilizados.

2.5.3. Vectores

Vectores	Objectivo:	Companhia:
pIC113	Expressão de GFP em células	Cheeseman and Desai, 2005
pCRF55	Expressão de Mob2GFP em células	
pENTR4	Vector de saída para clonagem	Invitrogen

Tabela 4 - Vectores utilizados em diferentes experiências, consoante os objectivos.

2.6. Técnicas Variadas

2.6.1. Manipulação de bactérias – Transformação

Descongelaram-se células competentes (200 μ l) e adicionou-se 1,5 μ l do DNA (~130ng/ μ l). Deixou-se a mistura no gelo, durante 20 minutos. Deu-se um choque térmico, durante 1 minuto, a 42°C. Imediatamente a seguir, puseram-se as células durante 3 minutos no gelo. Adicionou-se 400 μ l de LB e incubou-se 30-60 minutos, num agitador orbital, a 37°C. Plaqueou-se 50-100 μ l da suspensão numa placa de LB-agar (suplementada com o antibiótico desejado) e incubou-se *overnight* a 37°C.

2.6.2. Clonagem

Para a realização da clonagem começou-se por ampliar o nosso gene de interesse – hsMob2 – por PCR (*polymerase chain reaction*). De seguida correu-se o produto de PCR em gel de Agarose e extraiu-se o DNA da banda correspondente ao hsMob2, usando o kit “QIAEX II Agarose Gel Extration Protocol”. Utilizaram-se enzimas de restrição para cortar o nosso gene e para cortar o vector pENTRY, onde se iria inserir o gene hsMob2. Depois fez-se uma reacção de ligação, e com o DNA obtido transformaram-se células DH5 α . Obtiveram-se 4 colónias, designadas de I, II, III e IV.

Reacção de ligação: ligase (1 μ l), tampão ligase (2 μ l), DNA vector (pENTR4) e DNA insert (hsMob2). Perfez-se o volume com água, até um volume final de 20 μ l. Deixou-se uma hora à temperatura ambiente.

2.6.3. Restrições e Análise DNA:

As restrições enzimáticas foram feitas para um volume final de 20µL. Assim sendo, adicionou-se o equivalente a 1 µg de DNA, 2 µl de tampão de restrição 10x, 0.5 µl de enzima(s) de restrição 10u/µl. Perfez-se o volume com água desionizada. Resuspendeu-se gentilmente, centrifugou-se 5 segundos e incubou-se num banho seco (37°C, 2horas).

2.6.4. Gel de Agarose para electrofosere

Todos os resultados foram confirmados em gel de Agarose 1% (TAE 1X, Agarose 1%, brometo de etídio). Como marcador molecular usou-se o GeneRuler™ 1 kb Plus DA Ladder #SM1331 (Fermentas).

2.6.5. PCR (*polymerase chain reaction*)

Para um volume total de 50µl, juntou-se a amostra de 5µl de DNA (20 ηg/µl), 10µM de cada primer, 2mM de dNTPs mix (Invitrogen), 5µl de tampão de PCR 10x (50mM Tris-HCL (ph 9.2), 160mM (NH₄)₂SO₄, 17,5mM MgCl₂), e 10 unidades de enzima DreamTaq, em água, para um volume final de 50 µl.

As reacções de PCR tiveram um primeiro ciclo de desnaturação durante 5 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 53°C durante 40 segundos e 72°C durante 60 segundos. Após estes 30 ciclos seguiu-se um ciclo de extensão durante 10 minutos, a 72°C. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1%.

2.6.6. Oligonucleotídeos de DNA

Primers	Sequencia (5' – 3')	Características
IniCS1 (hsMob2)	AAATCCATGGAGCTCAAGCTT ATGGACTGGCTCATG	hsMob2 Direct – Locais de corte introduzidos NcoI/HindIII
IniCS2 (hsMob2)	CTGATATCGGGATCCACTTCT CTCCTTCACGTGGTT	hsMob2Reverse – Locais de corte introduzidos BamHi/Dpnl/EcoRV

Tabela 5 - Oligonucleotídeos de DNA utilizados.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização dos soros anti-hsMob2

A proteína hsMob2 é codificada por um dos sete genes Mob existentes no organismo humano. Devido aos resultados preliminares (**Florindo & Tavares, resultados não publicados**) que se apresentaram na introdução, pensou-se sobre a razão da separação centrossomal anormal em células sujeitas a RNAi do Mob2. Seria esta separação centrossomal anormal provocada pelo colapso dos centrossomas após a separação, ou não chegariam nunca a separar?

Para responder a esta questão, seria necessário seguir os centrossomas, filmando o seu comportamento em células vivas sem expressão de hsMob2. No entanto, decidiu-se começar por uma abordagem mais simples, através da análise de células fixas, de forma a compreender onde é que a proteína hsMob2 localiza, no interior da célula.

De forma a determinar a localização intracelular de hsMob2, decidiu-se fazer ensaios de imunofluorescência, tendo que se testar primeiro dois soros pré-existent no laboratório.

3.1.1. Especificidade dos soros ACR40 e ACR41 no reconhecimento da proteína hsMob2

Para determinar a localização intracelular da proteína hsMob2 endógena, foram utilizados dois soros policlonais de coelho – ACR40 e ACR41 – previamente produzidos no grupo. Ambos os anticorpos foram produzidos da mesma maneira, contra dois fragmentos peptídicos da proteína hsMob2 (**Figura 8**), só variando o animal utilizado.

```
MDWLMGKSKAKPNGKKPAAEERKAYLEPEHTKARITDFQFKELVVLPREIDLNEWLASNTTFFHHINLQYSTISEFCTGETC
QTMAVCNTOYYWYDERGKKVKCTAPQYVDFVMSSVQKLVTDDEVFPTKYGREFPSSFESLVRKICRHLFHVLAHIYWAHFKET
LALELHGHNLNTLYVHFILFAREFNLLDPKETAIMDDLTEVLCSGAGGVHSGGSGDGAGSGGPGAQNHVKER
```

Figura 8 - Sequência de aminoácidos da proteína hsMob2. A vermelho encontram-se os dois fragmentos peptídicos contra os quais os anticorpos foram feitos.

3.2. Localização intracelular da proteína hsMob2

Está previsto um peso de ~25kDa para a proteína hsMob2, e um peso de ~50kDa para a proteína de fusão GFP.Mob2.

O soro ACR40 foi testado em Western Blot, em extractos de células HeLa transfectadas com GFP.Mob2 e com GFP (**Figura 9**). Nesta experiência, o anticorpo anti-GFP reconhece as bandas GFP e GFP.Mob2, e o soro ACR40 reconhece uma banda com peso molecular correspondente ao esperado da proteína de fusão GFP.Mob2. No entanto não pode ser verificada a existência da banda correspondente ao Mob2 endógeno.

Repetiu-se a experiência, desta vez incubando outra membrana de Western-blot com o soro ACR41 e com o anticorpo anti-GFP. Obtiveram-se os mesmos resultados (**Figura 10**): o anticorpo anti-GFP reconheceu as bandas correspondentes ao GFP e à proteína de fusão GFP.Mob2, e o soro ACR41 reconheceu a banda correspondente à proteína de fusão GFP.Mob2. Não se visualizou nenhuma banda que pudesse corresponder ao hsMoB2 endógeno.

Obtidos estes resultados, decidiu-se fazer um Western-blot, usando células recolhidas transfectadas com Mob2RNAi e GFP-Mob2, de forma a verificar se a banda reconhecida pelos soros ACR40 e ACR41 desaparecia em células com baixa expressão de Mob2. Contaram-se as células transfectadas nos dias 2, 3 e 4 pós-transfecção (d.p.t.) (**Figura 11**), e a recolha das células foi feita ao longo desses dias.

De forma a se ter a mesma quantidade de proteína em cada poço fez-se um gel preliminar. Este gel foi carregado com as amostras e corado com Coomassie blue. Por comparação da intensidade das amostras (**Figura 12**), fez-se uma estimativa da quantidade de amostra a carregar em cada poço, para que se obtivesse iguais quantidades de amostra nos diferentes poços. Como eram 18 amostras, teve de se distribuir por dois géis de poliacrilamida. Para que a intensidade relativa fosse comum a todos os poços, escolheu-se uma amostra comum aos dois géis (Poço 9 – 3 d.p.t., células não transfectadas), a partir da qual de relativizaram as restantes.

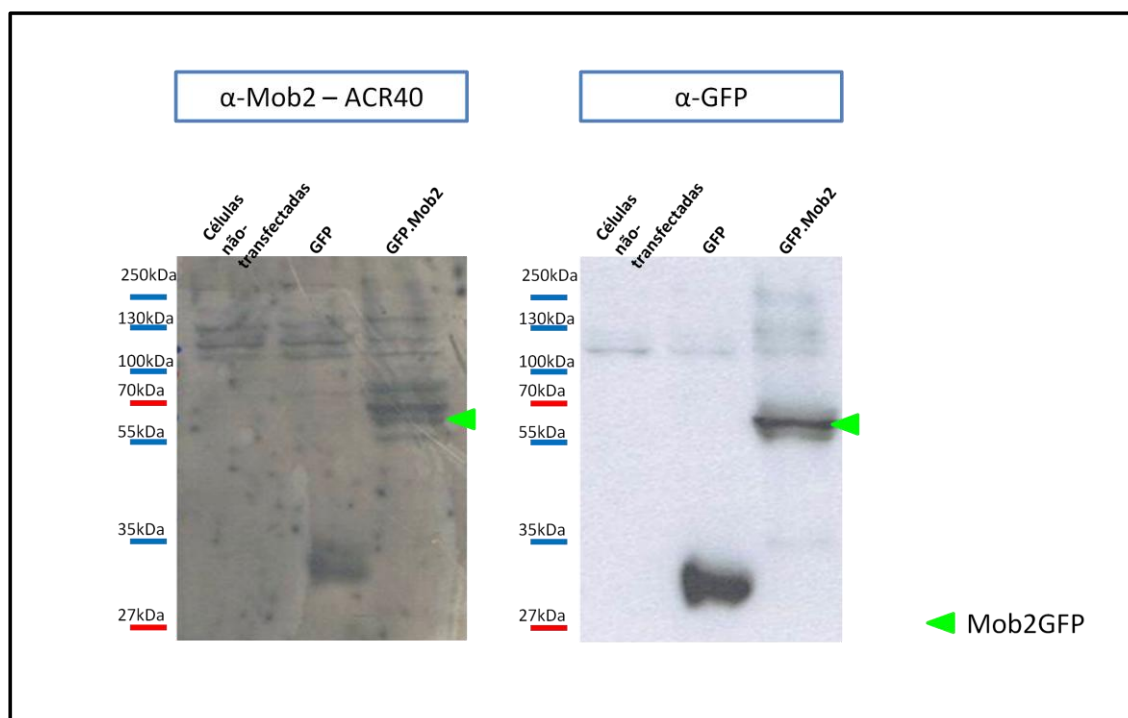


Figura 9 - Análise por Western Blot do soro anti-Mob2 ACR40 e do anticorpo anti-GFP. Membranas de Western realizadas com extracto de células HeLa transfectadas com células não-transfectadas (1), GFP (2) e Mob2GFP (3). A mesma membrana foi incubada com o soro ACR41 e com α -GFP. O ACR40 reconhece Mob2GFP em Western Blot.

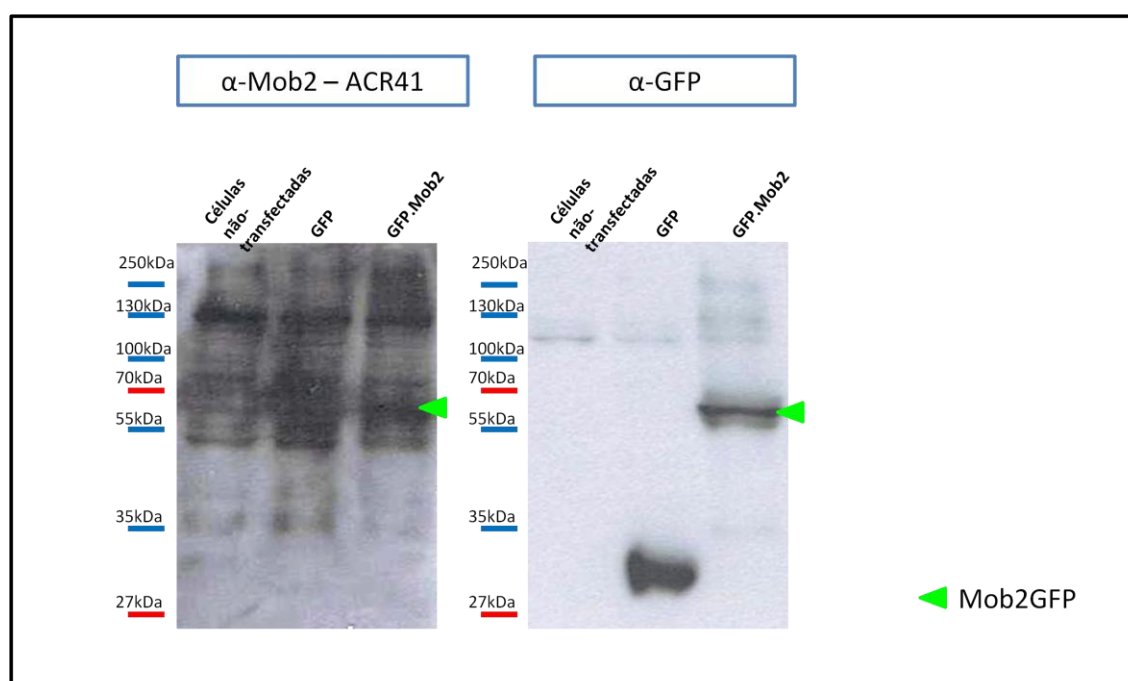


Figura 10 - Análise por Western Blot do soro anti-Mob2 ACR41 e do anticorpo anti-GFP. Membranas de Western realizadas com extracto de células HeLa transfectadas com células não-transfectadas (1), GFP (2) e Mob2GFP (3). A mesma membrana foi incubada com o soro ACR41 e com α -GFP. O ACR41 reconhece Mob2GFP em Western Blot.

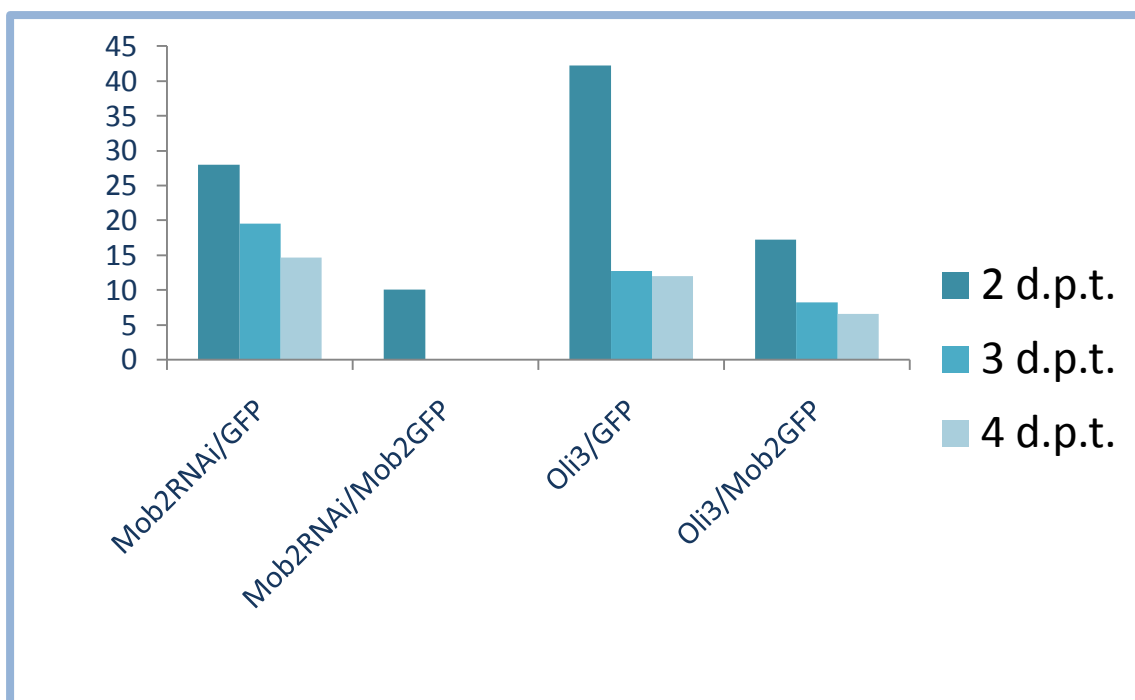


Figura 11 - Eficiência de transfecção de células HeLa com oligos de RNAi, 2 dias-pós-transfecção (d.p.t.), 3 d.p.t. e 4 d.p.t.

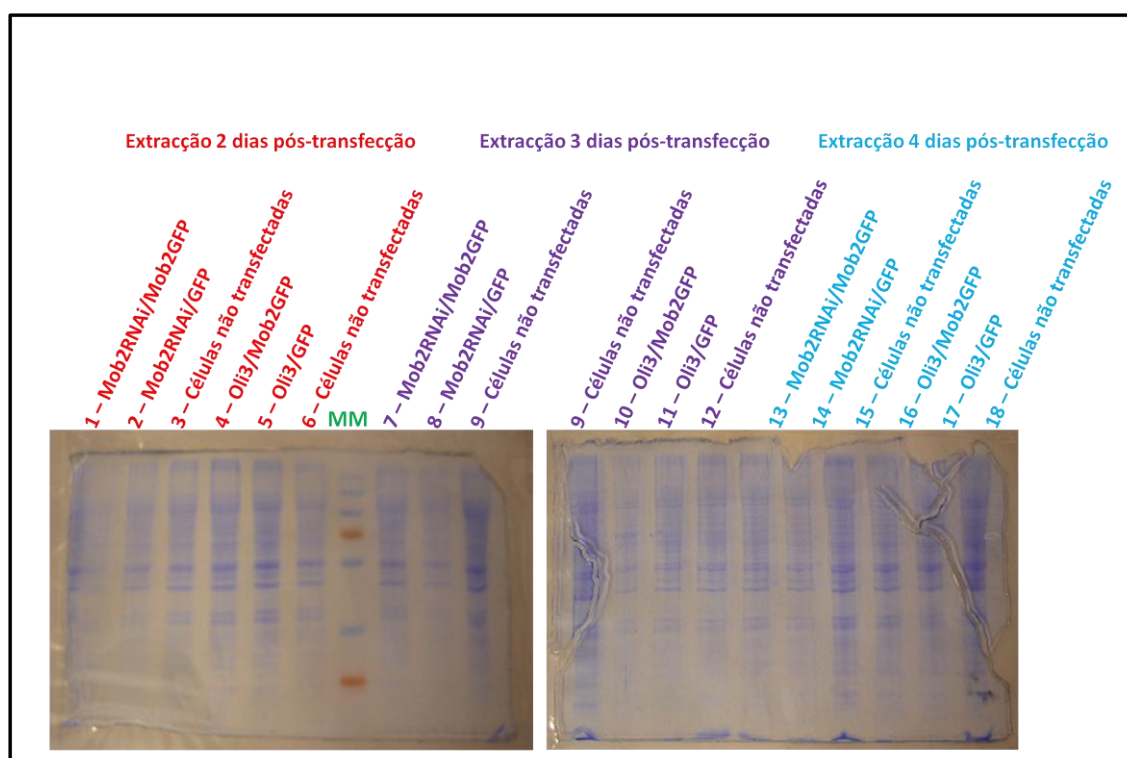


Figura 12 - Géis de poliacrilamida corados com solução comassie-blue, para quantificação relativa de proteína por poço. A amostra comum aos dois géis foi a extracção 3 d.p.t. de células não-transfectadas (poço 3, roxo).

Tendo-se averiguado a quantidade a amostra a carregar em cada poço, fez-se um Western-blot. Usaram-se as amostras de células HeLa não-transfectadas, e transfectadas com Oli3/GFP ou Oli3/GFP.Mob2 ou Mob2RNAi/GFP ou Mob2RNAi/GFP.Mob2.

As membranas correspondentes a 2, 3 e 4 d.p.t. foram incubadas com os soros ACR40 (**Figura 13**) e ACR41 (**Figura 14**), e re-incubadas com os anticorpos anti-GFP, anti- γ -tubulina e anti-lamina.

A incubação com anti-lamina funcionou como um controlo ao RNAi. Quando se observa o controlo da lâmina verifica-se que o RNAi foi bem realizado, pois a proteína lamina não é reconhecida nos poços transfectados com Oli3.

A incubação com anti- γ -tubulina tinha como objectivo funcionar como *loading control*. No entanto, os resultados preliminares mostraram que a intensidade da γ -tubulina nos pólos do fuso mitótico diminuía em células com baixa expressão da proteína hsMob2. Assim sendo, a incubação com anti- γ -tubulina não serve como um *loading control* para todos os poços, pois não se tem a certeza de que a sua concentração celular não varia.

Observa-se menos quantidade de proteína γ -tubulina no poço transfectado com RNAi do Mob2 (**Figura 13, Poço 4 – Mob2RNAi/GFP**).

Se a intensidade da lâmina no poço 4 da figura x fosse igual à intensidade da lâmina nos restantes poços (1 e 5), então podia-se pensar que a γ -tubulina tinha sido degradada, na ausência de hsMob2.

Na Figura 13, no poço com células transfectadas com Mob2RNAi/GFP, pode-se verificar que as bandas correspondentes à γ -tubulina e à lâmina são ambas menos intensas do que as suas homologas nos outros poços. Assim sendo, é provável que tenha havido um erro de carregamento da amostra no poço 4 da figura 13. Assumindo que a quantidade de γ -tubulina não sofre alteração em células com baixa expressão de hsMob2, e tendo em conta os resultados preliminares obtidos, pode-se sugerir que a γ -tubulina dissipa dos pólos do fuso mitótico para o citoplasma.

Quanto aos resultados obtidos para os soros ACR40 (**Figura 13**) e ACR41 (**Figura 14**), observa-se que ambos reconhecem uma banda com o mesmo peso molecular que a proteína de fusão GFP.Mob2, e que nos poços transfectados com Mob2RNAi esta banda está menos intensa. No entanto, não foi possível reconhecer a banda correspondente à proteína endógena, pois correu-se o gel de poliacrilamida em excesso.

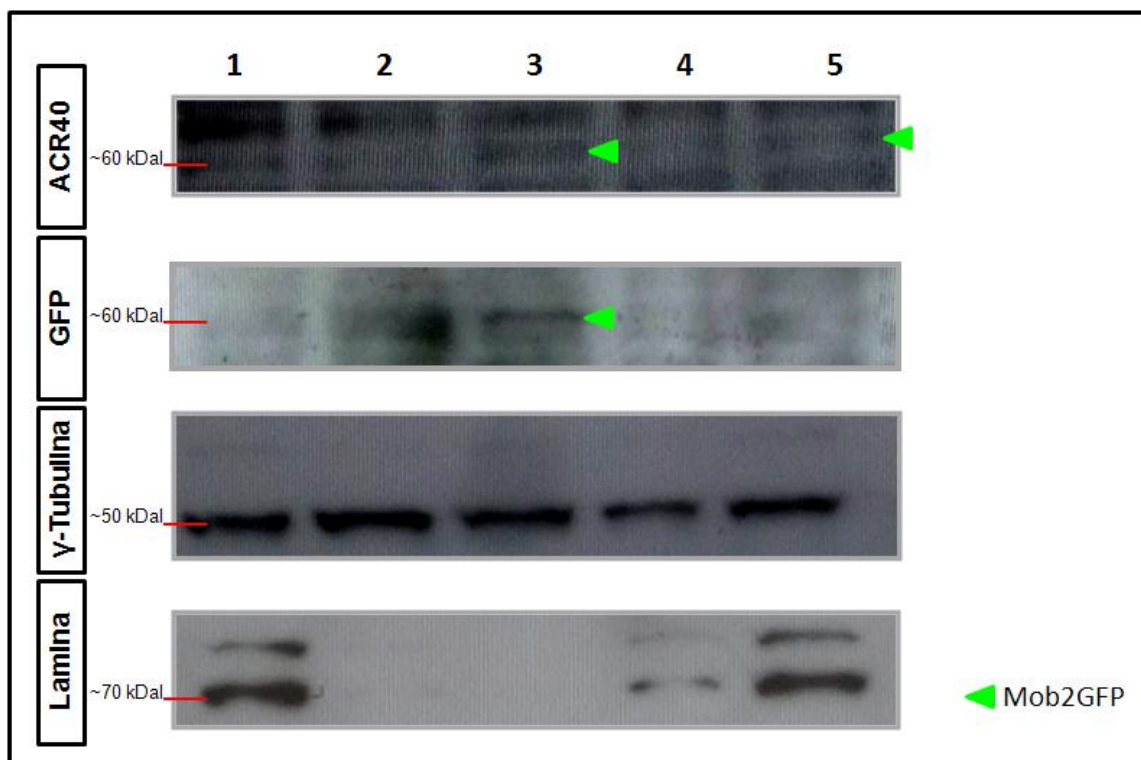


Figura 13- Membrana de Western-blot incubada com ACR40. Membrana de Western realizada com células HeLa: células não-transfectadas (1), transfecção com Oli3/GFP (2), Oli3/Mob2GFP (3), Mob2RNAi/GFP (4) e Mob2RNAi/Mob2GFP (5). A mesma membrana foi incubada com anticorpos ACR40, GFP, γ -Tubulina, e Lamina. O ACR40 reconhece Mob2GFP, e a banda desaparece em células transfectadas com Mob2RNAi/Mob2GFP, 4 d.p.t..

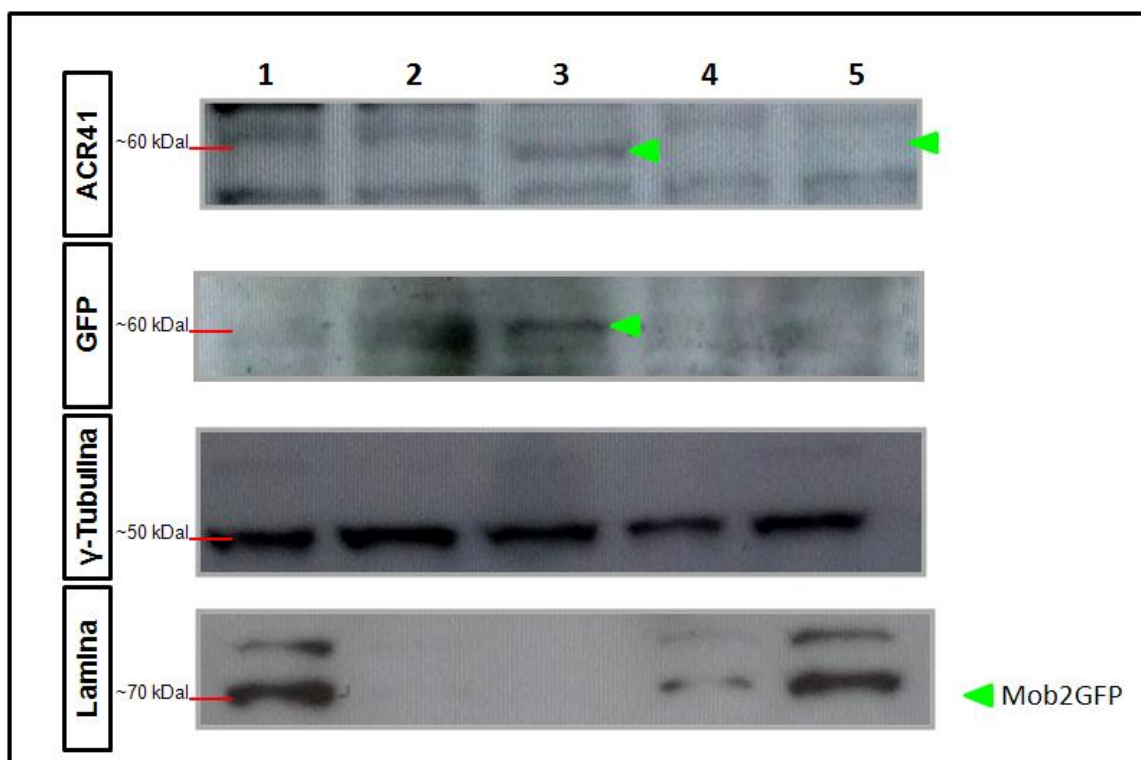


Figura 14 – Membrana de Western-blot incubada com ACR41. Membrana de Western realizada com extracto de células HeLa: células não-transfectadas (1), transfectadas com Oli3/GFP (2), Oli3/Mob2GFP (3), Mob2RNAi/GFP (4) e Mob2RNAi/Mob2GFP. (5). A mesma membrana foi incubada com anticorpos ACR41, GFP, γ -Tubulina, e Lamina. O ACR41 reconhece Mob2GFP em Western Blot e banda desaparece em células transfectadas com Mob2RNAi/Mob2GFP, 4 d.p.t..

3.2.1. Imunolocalização de hsMob2

De forma a perceber qual a localização intracelular da proteína hsMob2 durante o ciclo celular, fizeram-se ensaios de imunofluorescência usando os dois soros, ACR40 e ACR41, e incubando as células com β -tubulina, que localiza no fuso mitótico, e com γ -tubulina, que localiza nos centrossomas.

3.2.1.1. ACR40

Utilizando o soro ACR40, tentou-se perceber qual seria a localização celular da proteína hsMob2 em células HeLa, ao longo do ciclo celular. Foram feitos vários ensaios de imunofluorescência, variando as condições de realização, os métodos de fixação e as diluições de anticorpos utilizadas, numa tentativa de otimizar os resultados obtidos. As células também foram incubadas com anti-tubulina (β - ou γ -).

Os resultados mostraram que o soro ACR40 marca os pólos do fuso mitótico, em profase (**Figura 15.A – D**), e em células em citocinese (**Figura 16**) é óbvia a marcação no anel do corpo central. Também marca os centrossomas, durante a interfase (**Figura 17**).

3.2.1.2. ACR41

De seguida, usando-se o soro ACR41, realizaram-se ensaios idênticos de imunofluorescência, usando diferentes métodos de fixação e diluições de anticorpos, e incubando as células com anti-tubulina (β - ou γ -).

Observou-se que a marcação obtida com o soro ACR41 é no fuso mitótico, em células em metafase (**Figura 18.E – H**). Em células em anafase (**Figura 18.I – L**) há uma ligeira acumulação na zona intermédia do fuso mitótico, e na telofase (**Figura 18.M – P**) a proteína hsMob2 começa a localizar no anel contráctil. Na citocinese (**Figura 19**) a proteína hsMob2 localiza no corpo central. Observando-se células em interfase (**Figura 20**), verificou-se que cerca de 80% das células incubadas com anti- γ -tubulina também foram marcadas nos centrossomas pelo soro ACR41.

A passagem de sinal pode ser um problema em microscopia. Para a observação da fluorescência emitida pelo ACR41 utilizou-se o filtro FITC (gama dos verdes) e para observação da fluorescência emitida pelo anticorpo secundário ligado à tubulina utilizou-se o filtro Alexas 568 (gama dos vermelhos). Cada um destes filtros deixa passar um determinado comprimento de onda. No entanto, se houver uma sobreposição da gama de comprimentos de onda que os atravessam, quando se observa uma estrutura através de um dos filtros pode-se estar também a observar uma passagem de sinal de outra estrutura que emita fluorescência com um comprimento de onda compatível com o filtro utilizado. A isso chama-se passagem de sinal. Na prática, isso poderia influenciar os resultados. Sabendo que a β -tubulina está localizada no fuso mitótico, a aparente marcação do fuso mitótico pelo soro ACR41 poderia ser fruto de uma passagem de sinal, devido à fluorescência da β -tubulina. Assim sendo, decidiu-se incubar as células só com o soro ACR41, de forma a impedir que houvesse passagem de sinal. Observou-se que a proteína hsMob2 estava localizada no fuso mitótico (**Figura 21**).

3.2.1.3. Expressão transiente da proteína de fusão hsGFP.Mob2

Depois da localização da hsMob2 com os soros ACR40 e ACR41, quiseram-se confirmar os resultados obtidos. Para isso, utilizou-se a proteína de fusão GFP.Mob2 para a localização: caso as estruturas localizadas fossem as mesmas, os resultados estariam confirmados.

Transfectaram-se células HeLa com os plasmídeos pCRF55 e pIC113, capazes de induzir a expressão de hsGFPMob2 e GFP, respectivamente. Após a transfecção das células, fez-se ensaio de imunofluorescência, incubando-as com anti- γ -tubulina, anti- β -tubulina ou anti-MKLP1. A proteína de fusão GFP.Mob2 localizou no corpo central (**Figura 22**; **Figura 23**). Quando incubadas as células com anti-MKLP1 pôde-se observar o corpo central internalizado e verificou-se que a proteína de fusão GFP.Mob2 localizava no corpo central internalizado (**Figura 24**). Também se observou, em células em interfase, localização da proteína de fusão em estruturas que aparentavam ser os centrossomas: eram esféricas, por vezes aos pares, e sempre perto do núcleo. No entanto, não foi possível confirmar estes resultados.

A localização da proteína hsMob2 no corpo central é óbvia: há uma constante localização no corpo central, quer dos dois soros (ACR40 e ACR41), quer da proteína de fusão. No entanto, a localização nas restantes estruturas não foi confirmada, uma vez que não houve exactamente a mesma localização para os soros e a proteína de fusão. Os soros aparentam ter diferente especificidade: ao se utilizar o soro ACR40, a proteína hsMob2 está localizada durante a profase nos pólos do fuso mitótico, e com a utilização do soro ACR41 observa-se uma localização da proteína hsMob2, em metáfase, no fuso mitótico e no corpo central do fuso.

	Interfase	Profase	Metafase	Anafase	Telofase	Citocinese
ACR40	Centrossomas	Polos do fuso mitótico				Corpo central
ACR41	Centrossomas		Fuso mitótico; Pólos do fuso	Corpo central do fuso	Anel contráctil	Corpo central
GFP.Mob2	Corpo central internalizado; Centrossomas?					Corpo central

Tabela 6 - Resumo da localização do hsMob2 ao longo do ciclo celular, consoante o método de detecção utilizado.

Destes resultados pode-se concluir que a proteína hsMob2 localiza no corpo central e nos centrossomas. Fica a dúvida quanto à sua localização no fuso mitótico, nos pólos do fuso e no corpo central do fuso.

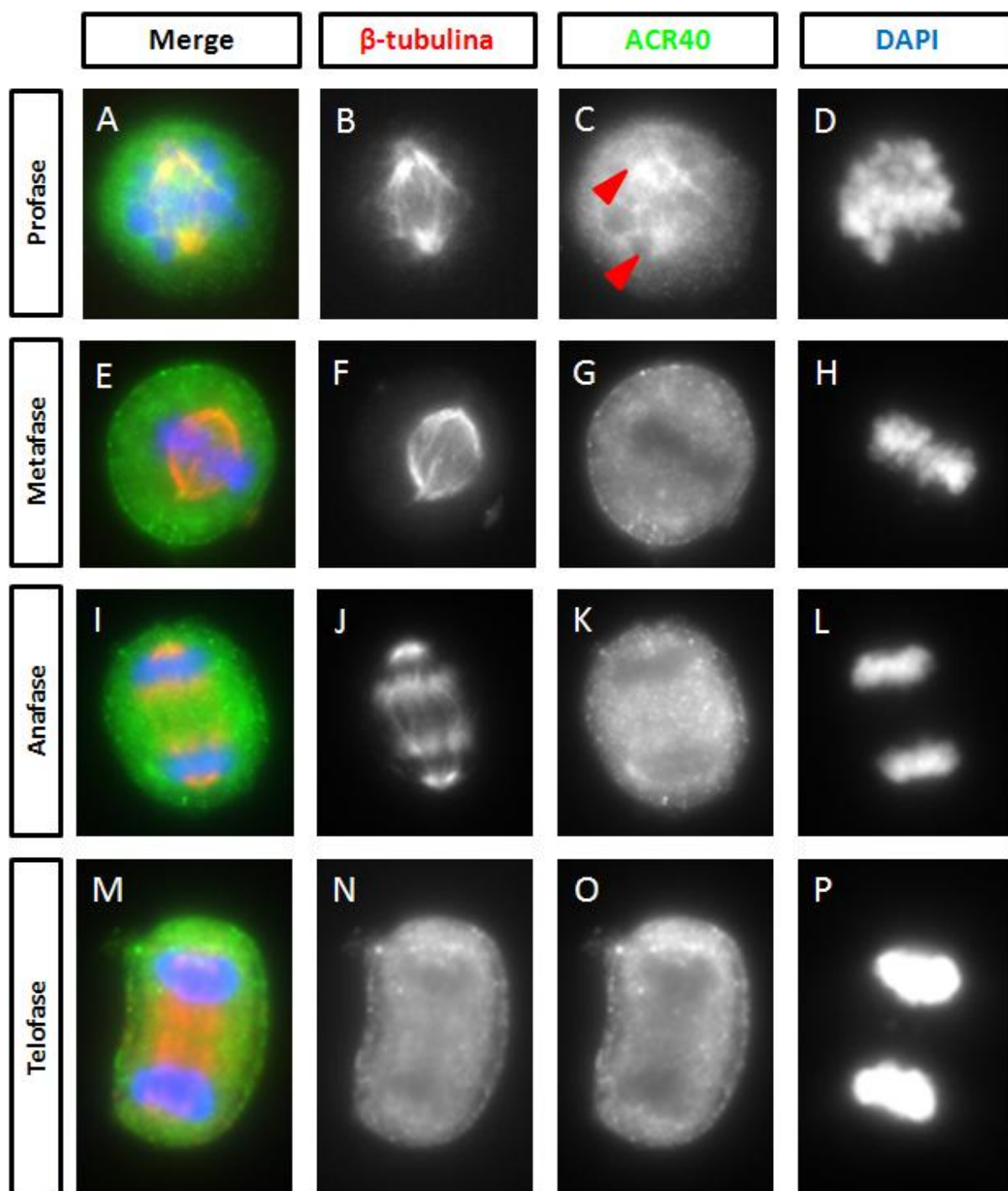


Figura 15 - Localização intracelular do ACR40 ao longo do ciclo celular. Imunofluorescência de células HeLa. Células incubadas com β -tubulina (vermelho), ACR40 (verde) e DAPI (azul). A – D: Célula em profase. Fuso começa a formar-se (B), ACR40 parece localizar nos polos do fuso (C) e DNA começa a condensar (D). E – H: Célula em metáfase. Fuso mitótico formado (F), e cromossomas alinhados. I – L: Célula em anáfase. Microtúbulos começam a puxar os cromossomas (I), e os cromossomas são puxados para os polos (L). M – P: DNA começa a descondensar (P). A vermelho encontra-se a β -tubulina que localiza nos microtúbulos, a verde o ACR40, e a azul o DAPI e marca o DNA. Mob2 localiza nos pólos do fuso (setas vermelhas).

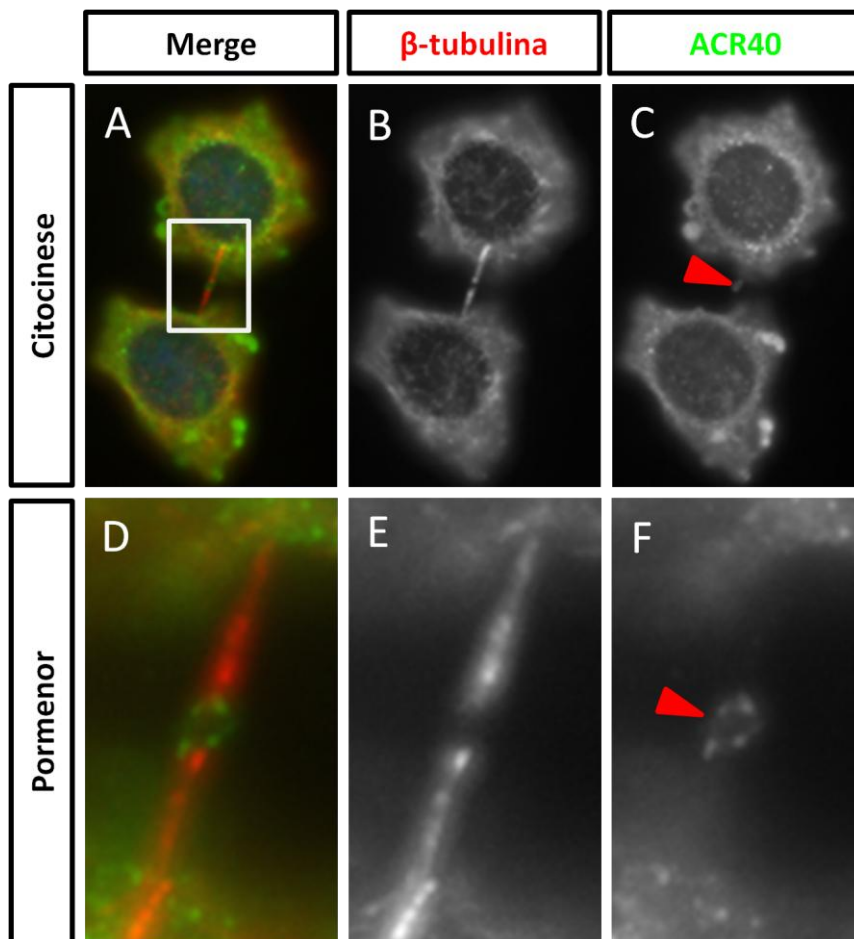


Figura 16 - Localização intracelular do ACR40 em células em citocinese. Imunofluorescência de células HeLa. Célula em interfase incubada com β -tubulina (vermelho), ACR40 (verde) e DAPI (azul) (A – D), e pormenor da mesma célula (E – G). Formação da ponte intercelular e localização do ACR40 no midbody (C, G, seta vermelha).

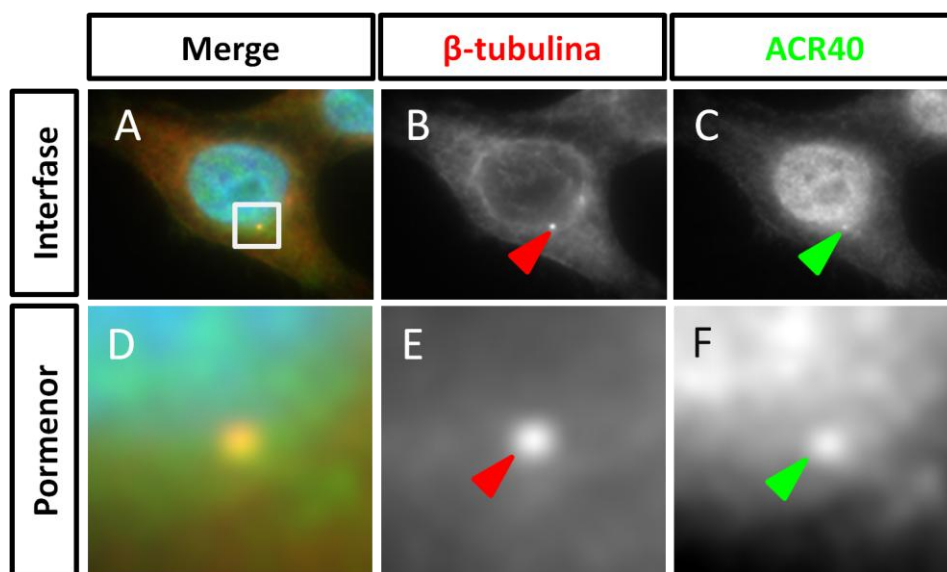


Figura 17 - Localização intracelular do ACR40 em células em interfase. Imagens de Imunofluorescência de células em Interfase (A – D) incubadas com β -tubulina, ACR40 e DAPI. β -tubulina marca os centrosomas (B, F, seta vermelha) e o ACR40 também localiza nos centrosomas (C, G, seta verde).

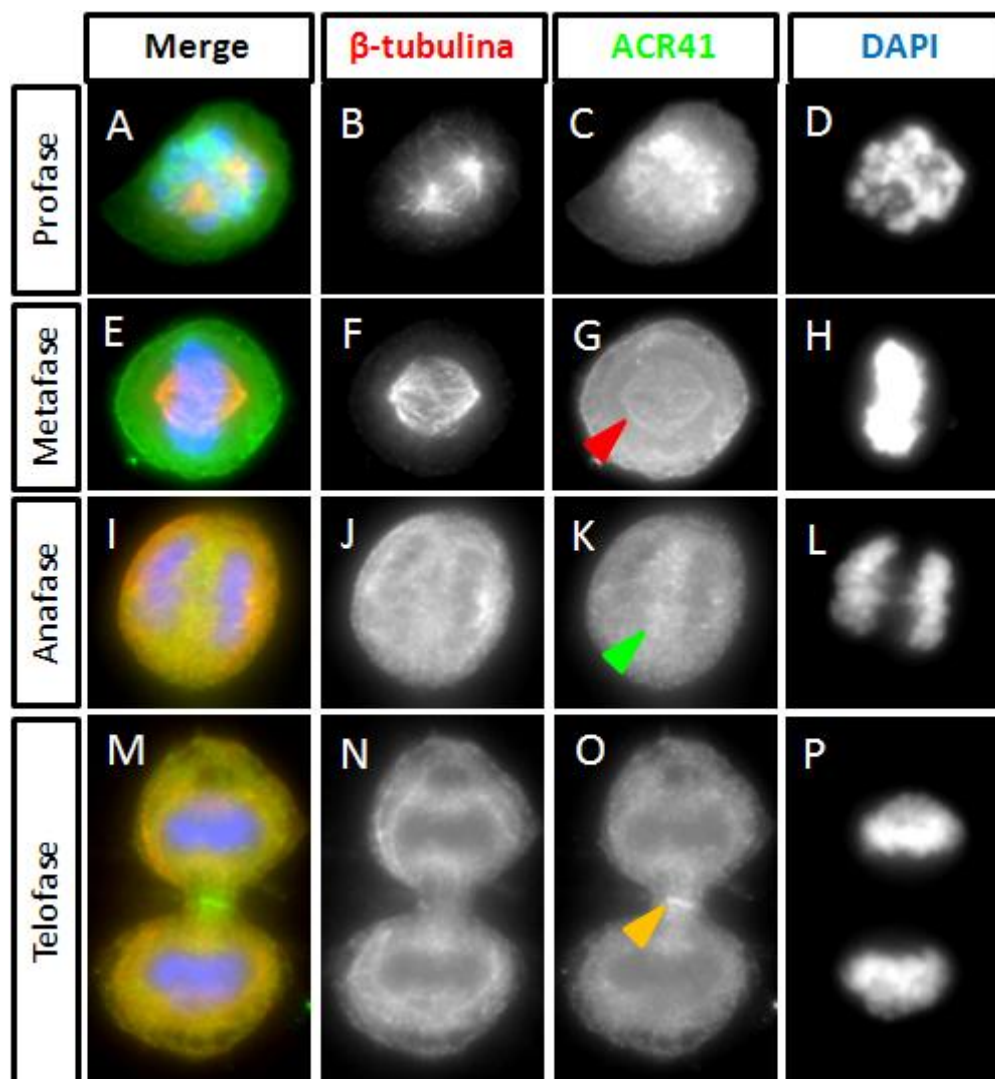


Figura 18 - Localização intracelular do ACR41 ao longo do ciclo celular. Imunofluorescência de células HeLa. Células incubadas com β -tubulina, ACR41 e DAPI. A – D: Célula em Profase. Fuso começa a formar-se (B), e DNA começa a condensar (D). E – H: Célula em Metafase. Fuso formado (F), ACR41 marca o fuso (G, seta vermelha), e cromossomas alinham (H). I – L: Célula em Anafase. ACR41 localiza na região central do fuso (K, seta verde). Cromossomas começam a ser puxados para os polos da célula (L). M – P: Célula em telofase. ACR41 localiza no anel de actina-miosina (O, seta laranja) e DNA começa a descondensar (P).

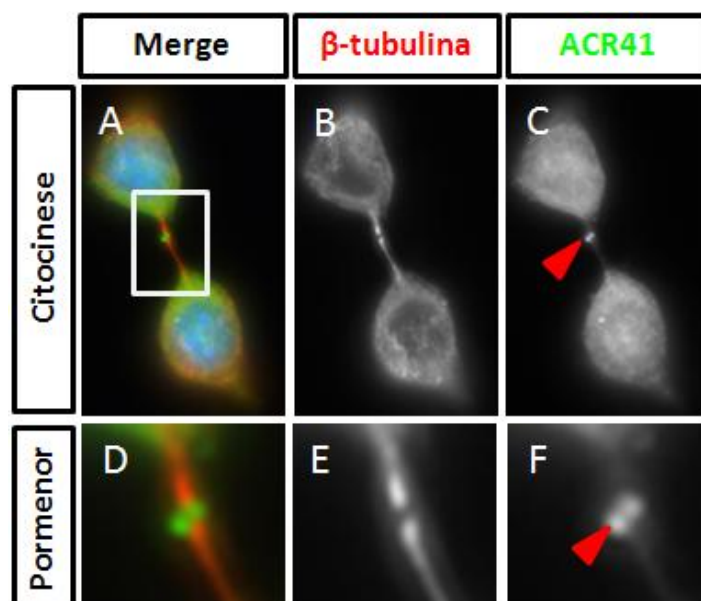


Figura 19 - Localização intracelular do ACR41 em células em citocinese. Imunofluorescência de células HeLa. Células incubadas com β -tubulina, ACR41 e DAPI. A – D: Célula em citocinese. Formação da ponte intercelular. ACR41 localiza no midbody (C, F, seta vermelha).

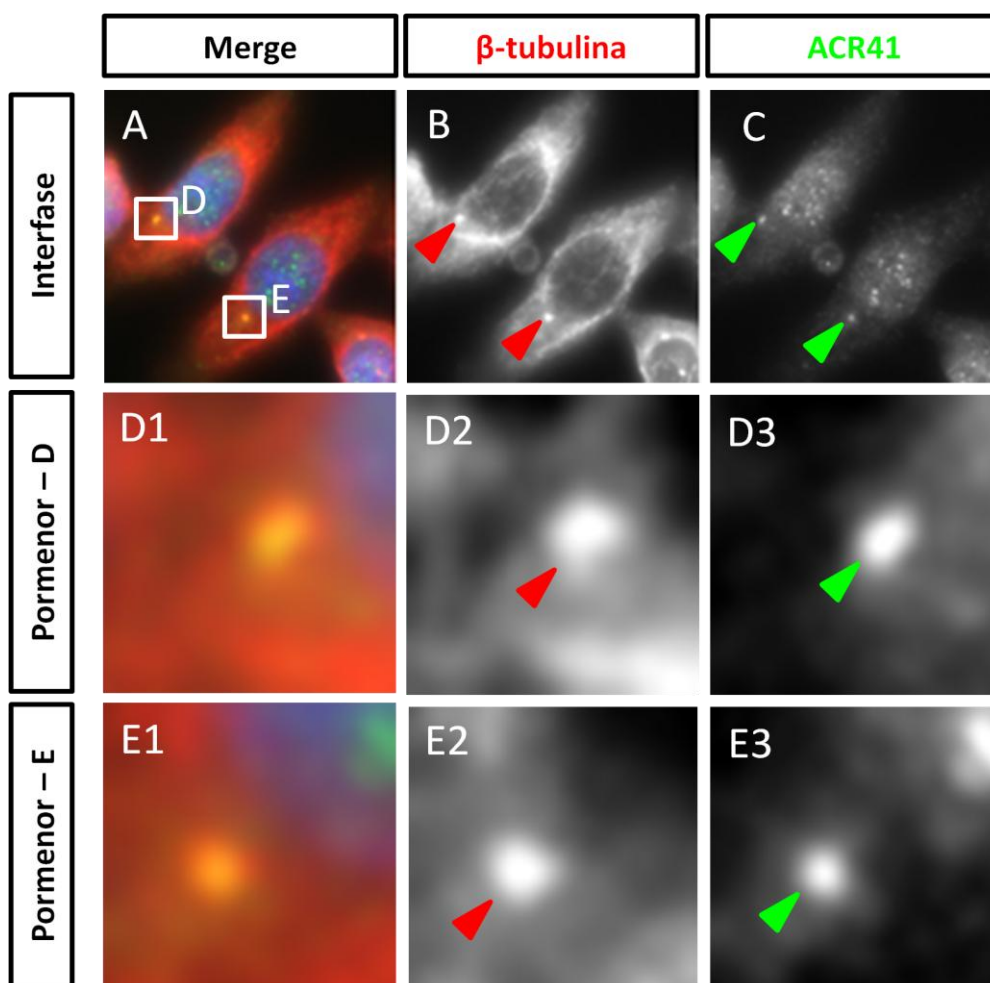


Figura 20 - Localização intracelular do ACR41 em células em interfase. Imagens de imunofluorescência de células em Interfase (A – D) incubadas com β -tubulina, ACR41 e DAPI. β -tubulina marca os centrosomas (B, D2, E2, seta vermelha) e o ACR41 também localiza nos centrosomas (C, D3, E3, seta verde).

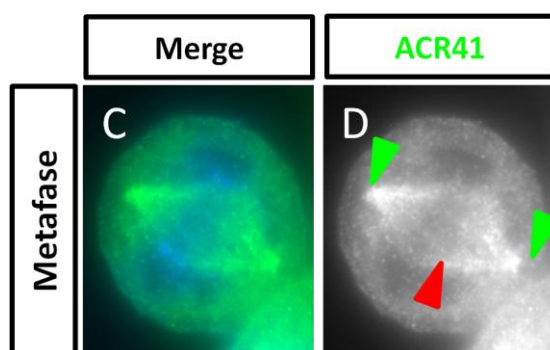


Figura 21 - Localização intracelular do ACR41 em células em metafase. Imunofluorescência de células HeLa. Células incubadas com ACR41 (verde) e com DAPI (azul). É visível a localização do ACR41 no fuso mitótico (D, seta vermelha), e nos pólos do fuso mitótico (D, seta verde).

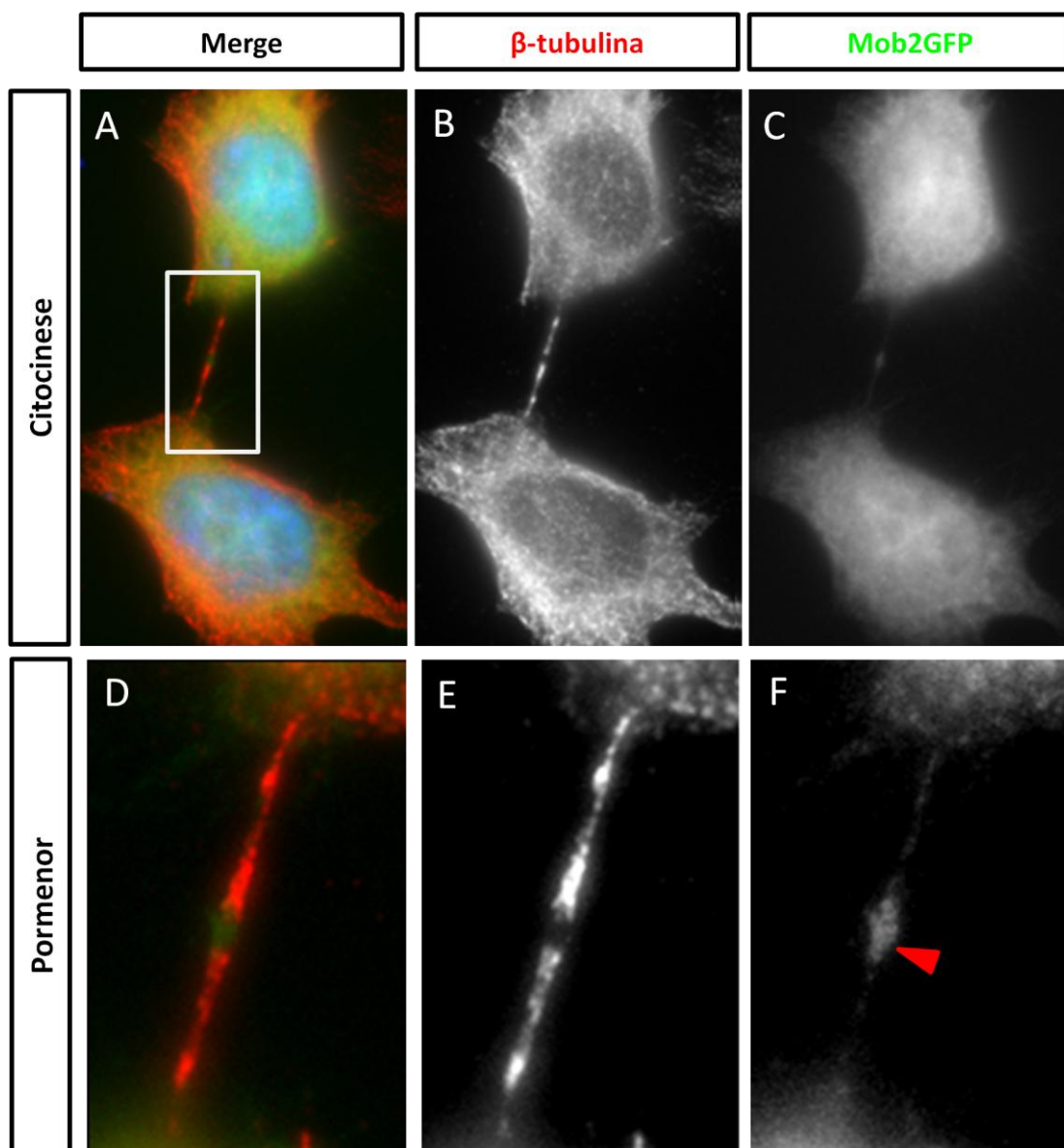


Figura 22 – Localização intracelular do Mob2.GFP em células em citocinese. (Fluorescência). Célula transfectada com Mob2GFP, e incubada com β -tubulina e DAPI. (A – C) Pormenor da ponte intercelular (D – F). Mob2GFP localiza no midbody (C, F, seta vermelha).

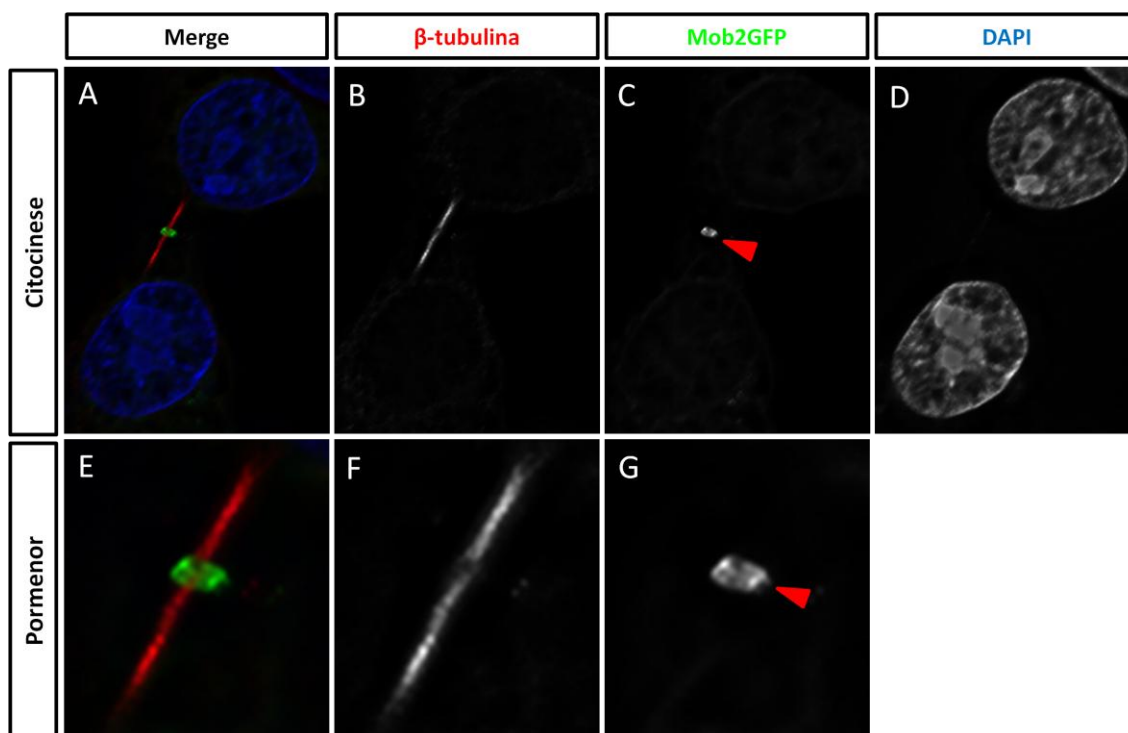


Figura 23 - Localização intracelular do Mob2GFP em células em citocinese. Fluorescência de células HeLa. Célula transfectada com Mob2GFP, e incubada com β -tubulina e DAPI (A – D). Pormenor da ponte intercelular (E – G). Mob2GFP localiza no midboy (C, G, seta vermelha). Imagem tratada com desconvolução software Huygens e Max. Intensity Projection.

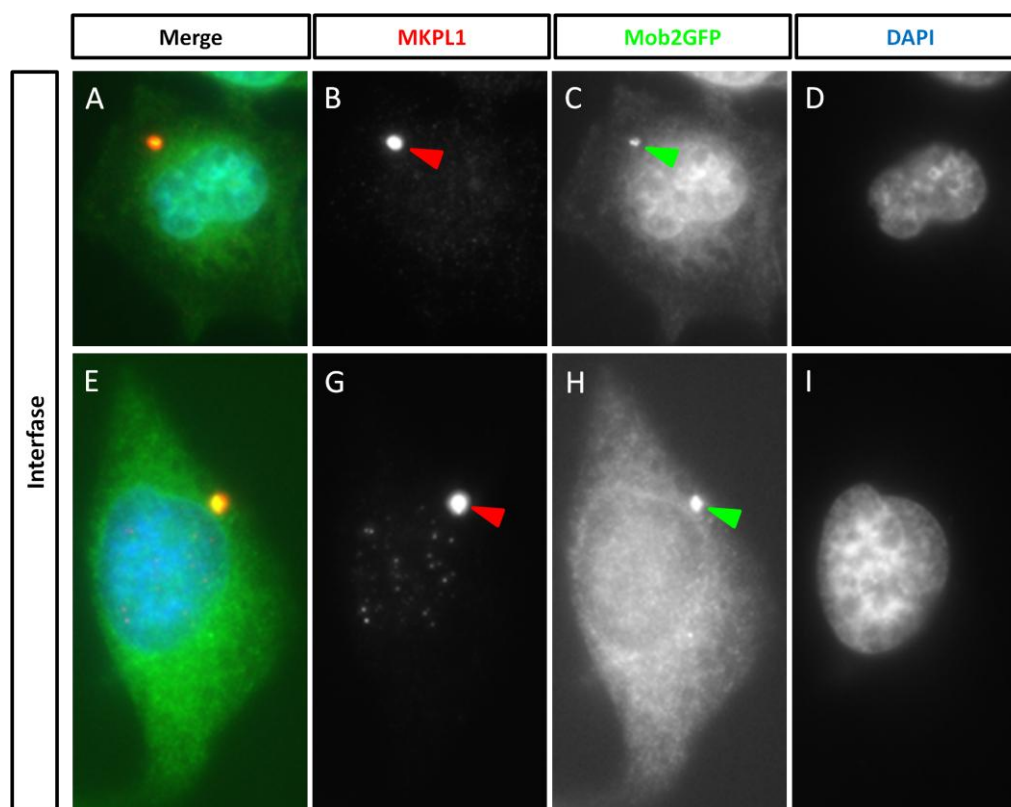


Figura 24 - Localização intracelular do Mob2GFP em células em interfase, com incubação com MKPL1. Células transfectadas com Mob2GFP, e incubadas com MKPL1 (A – D; E – I). MKPL1 marca os midbodies internalizados (B, G, seta vermelha) e o Mob2GFP está presente nos midbodies internalizados (C, H, seta verde).

3.3. Clonagem Mob2 em pENTR4

Os soros ACR40 e ACR41 são soros policlonais. Como tal, os diferentes anticorpos que os constituem correspondem à resposta imunitária a diferentes antígenos. Neste conjunto de anticorpos está o que reconhece a proteína hsMob2. Para maximizar os resultados seria desejável purificar o anticorpo α -Mob2, e para purificar o anticorpo é necessário ter a proteína hsMob2 purificada. Uma das maneiras de purificar proteína é a partir da sua produção em grande escala, recorrendo ao uso de baculovírus. Tendo-se definido este objectivo, decidiu-se clonar o nosso gene de interesse – hsMob2 – no vector pENTR4, para que desta forma seja possível clonar o gene Mob2 em baculovírus.

No final da clonagem hsMob2 em pENTR4, obtiveram-se 4 colónias. De forma a confirmar se alguma destas colónias era a desejada – pENTR4.hsMob2 – foi feita uma restrição com as enzimas NcoI/HindIII. O DNA que correspondente ao hsMob2 tem cerca de 700pb, ao passo que o peso molecular do resto do plasmídeo terá sensivelmente 2300pb (**Figura 25**). O resultado desta restrição é mostrado na **Figura 26**. Para as colónias I, II, e III obteve-se o mesmo padrão de corte, que não correspondia ao desejado. No entanto, para a colónia IV, obteve-se o corte desejado, ou seja, duas bandas, uma com 700pb, e outra com 2300pb,

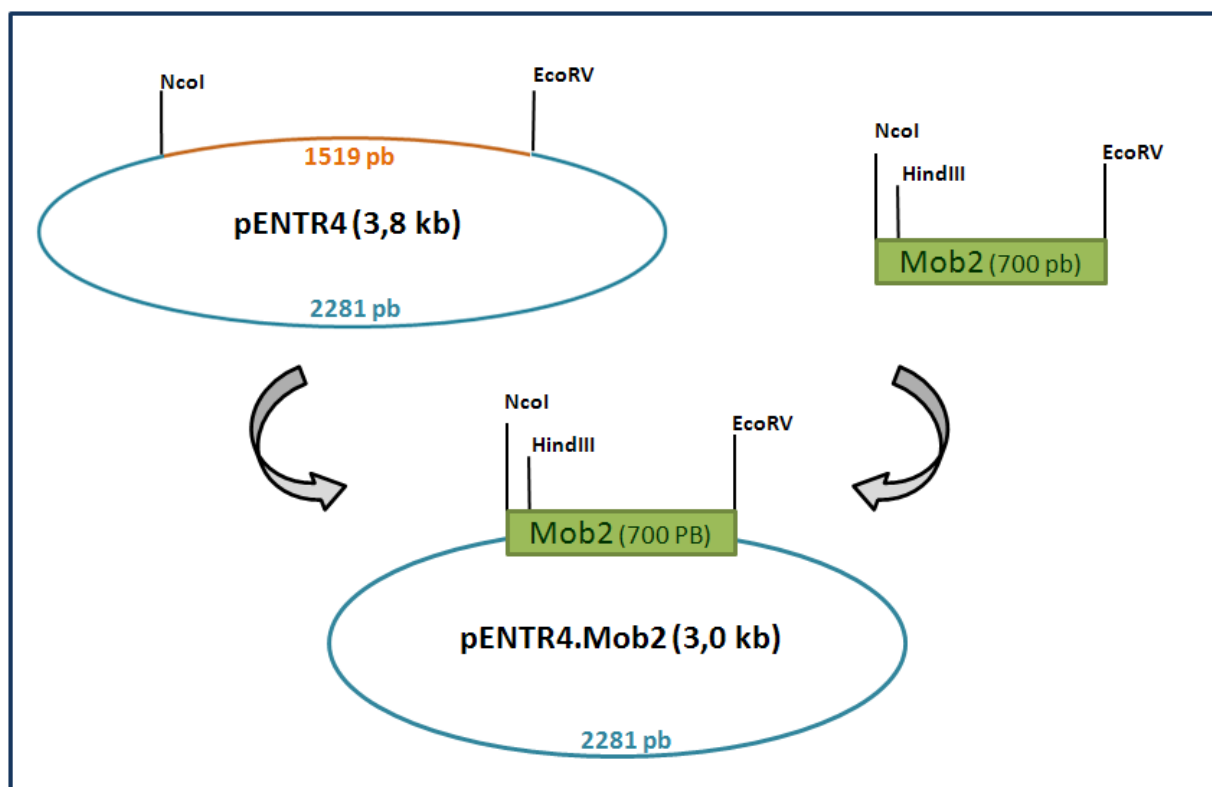


Figura 25 - Representação esquemática do vector pENTR4, do Mob2 e do clone que se quer obter pENTR4-Mob2. Locais de corte das enzimas NcoI, EcoRV e HindIII e os pesos moleculares dos diferentes fragmentos.

aproximadamente. Concluiu-se que, das quatro colónias, só a colónia IV é que poderia corresponder ao clone pENTR4-Mob2.

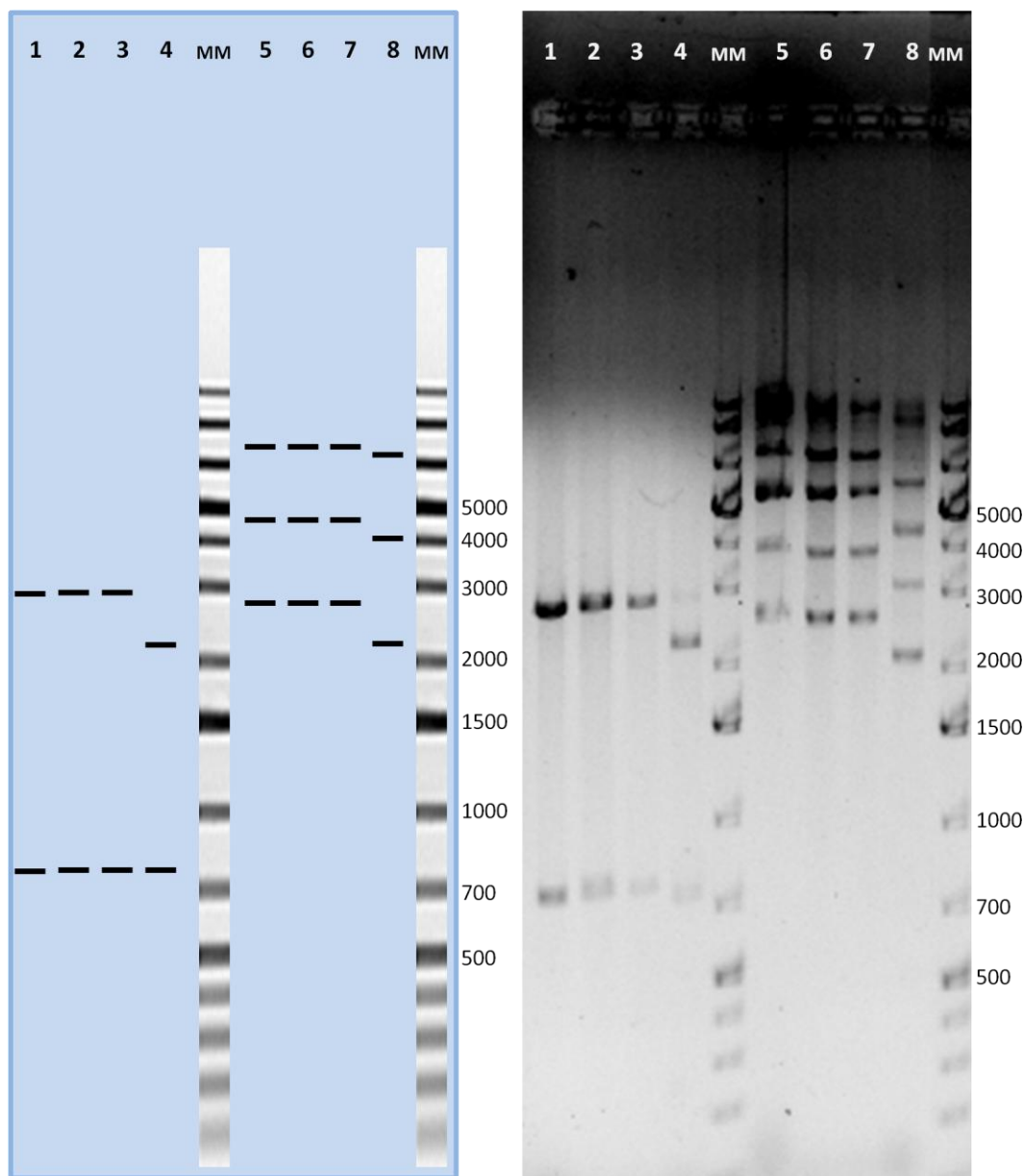


Figura 26 - Clonagem do Mob2 em pENTR4 (gel de agarose). Poços 1 – 4: DNA digerido. Poços 5 – 8: DNA não digerido. 1 – Colónia 1 digerida com EcoRV e NcoI. 2 – Colónia 2 digerida com EcoRV e NcoI. 3 – Colónia 3 digerida com EcoRV e NcoI. 4 – Colónia 4 digerida com EcoRV e NcoI. 5 – Colónia 1 não-digerida. 6 – Colónia 2 não-digerida. 7 – Colónia 3 não-digerida. 8 – Colónia 4 não-digerida. MM – Marcador molecular. Colónias 1, 2 e 3 semelhantes entre si. Colónia 4 com o peso esperado (4) (700pb + 2300pb).

Para se saber se a colónia IV correspondia realmente ao clone desejado, decidiu-se fazer novas restrições com o DNA da colónia IV, usando as enzimas EcoRV, HindIII, e NcoI. Os locais de corte da NcoI e da HindIII estão fisicamente próximos, separados apenas por 10 pares de bases, não tendo por isso o gel de agarose sensibilidade para os distinguir.

O resultado obtido foi o desejado e está apresentado na **Figura 27**. Quando se fez a restrição da colónia IV com uma só enzima (HindIII, NcoI, ou EcoRV) obteve-se uma banda com um peso molecular de 3000 pb, peso esperado para o plasmídeo. Quando se fez uma restrição com NcoI/EcoRV ou com HindIII/EcoRV, o resultado foi idêntico, obtendo-se duas bandas de aproximadamente 700pb e 2300pb. Quando a restrição foi feita com as enzimas HindIII/NocI obteve-se uma só banda, devido à proximidade do local de corte destas duas enzimas.

Concluiu-se que o clone obtido é o pENTR4Mob2. No entanto, seria desejável confirmar que o clone obtido é o pENTR4Mob2 por sequenciação do DNA.

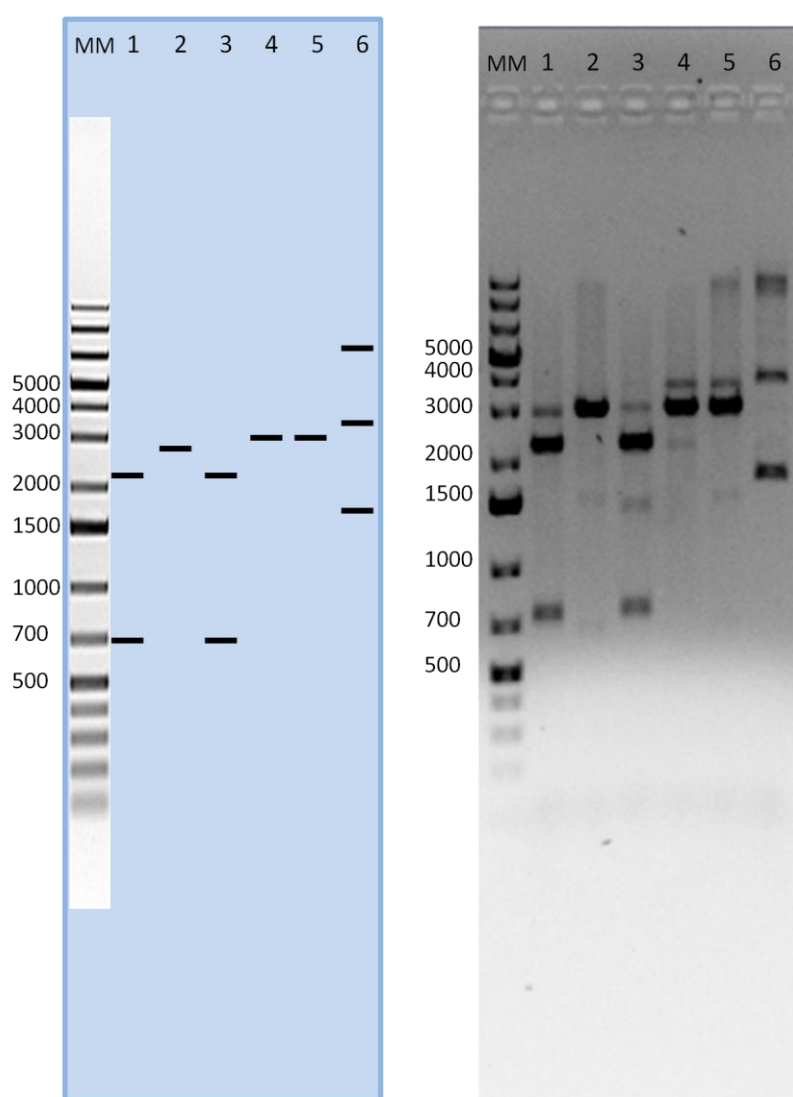


Figura 27 - Clonagem do Mob2 em pENTR4 (gel de agarose). Colónia nº4. 1 – EcoRV/HindIII; 2 – NcoI/HindIII; 3 – NcoI/EcoRV; 4 – EcoRV; 5 – HindIII; 6 – DNA não-digerido; MM – Marcador Molecular.

4. DISCUSSÃO

4.1. Especificidade dos soros policlonais ACR40 e ACR41

Os soros ACR40 e ACR41 correspondem ao soro total recolhido do animal após a sua imunização com a proteína humana hsMob2. Nestes soros estão presentes uma grande quantidade de anticorpos: anticorpos produzidos contra antigénios a que o animal esteve exposto durante a sua vida, entre eles o nosso anticorpo de interesse, α -hsMob2.

Este é o motivo pelo qual, em Western-Blot, ambos os soros ACR40 e ACR41 reconhecem inúmeras bandas.

A incubação com anti-GFP permite-nos saber qual a banda correspondente à proteína de fusão GFP-Mob2, sendo o peso molecular desta ~60 kDal. Por comparação desta banda com as bandas obtidas na incubação com os soros ACR40 e ACR41, pode-se saber qual das bandas corresponde à proteína de fusão (**Figura 9; Figura 10**).

Em ambos os soros, a banda da proteína de fusão GFP.Mob2 aparece de forma ténue. Isto acontece provavelmente por causa da eficiência de transfecção da proteína de fusão GFP.Mob2 ser ~20%.

Após isto, realizou-se outro Western-blot, desta vez com células transfectadas com Oligos de RNAi. Desta forma, seria possível avaliar o comportamento da banda correspondente à proteína de fusão.

Ambos os soros, ACR40 e ACR41, reconheceram a banda da proteína de fusão, e nos poços com células transfectadas com Mob2RNAi a banda da proteína de fusão não foi reconhecida (**Figura 13; Figura 14**)

O controlo da lâmina confirmou que a técnica de RNAi foi realizada com sucesso, pois não apareceu nenhuma banda nos poços transfectados com Oli3.

Nos resultados preliminares, obtidos por Florindo e Tavares, quando observadas células cuja expressão de Mob2 estava diminuída, a intensidade de γ -tubulina nos pólos do fuso mitótico diminuía (**Figura 6**). Por este motivo, a γ -tubulina seria um mau *loading control*, pois a localização e disponibilidade intracelular da γ -tubulina pode variar.

Observando os resultados obtidos (**Figura 13**) especula-se sobre o carregamento de amostra no poço 4, o qual aparenta ter sido mal carregado devido à menor quantidade de proteína γ -

tubulina nesse poço. No entanto, no controlo da lâmina, proteína que também existe em menor quantidade neste poço e a qual não deveria variar intracelularmente, ajuda a perceber que o poço foi, de facto, mal carregado. Se tivesse sido correctamente carregada a amostra no poço, provavelmente a quantidade de proteína γ -tubulina disponível não variaria significativamente

Tendo em conta os resultados preliminares, pode-se supor que, muito provavelmente, a γ -tubulina não é degradada (a quantidade disponível intracelular mantém-se) mas dissipa dos pólos do fuso mitótico para o citoplasma.

4.2. Toxicidade celular da proteína hsMob2

Ao longo deste trabalho, verificou-se que sempre que se fizeram transfecções com os vectores pCRF55 e pIC113, a eficiência de transfecção foi sempre mais elevada nas células transfectadas só com GFP (vector pIC113) do que nas células transfectadas com a proteína de fusão GFP.hsMob2 (vector pCRF55). Isto sugere que a sobreexpressão da proteína hsMob2 possa ser tóxica.

4.3. Imunolocalização intracelular da proteína hsMob2

Quando se compara a localização intracelular da proteína hsMob2 obtida, observa-se que os soros não localizam exactamente nas mesmas estruturas.

Enquanto o ARC40 marca os pólos do fuso mitótico, em profase (**Figura 15**), o ACR41 marca o fuso mitótico (**Figura 18**) e os pólos do fuso (**Figura 21**), durante a metafase, e o corpo central do fuso, na anafase (**Figura 18**). No entanto, verifica-se um padrão relativamente ao resto da localização intracelular: ambos os soros marcam os centrossomas, durante a interfase (**Figura 17**; **Figura 20**), e o corpo central, durante a telofase e a citocinese (**Figura 16**; **Figura 19**).

Os soros policlonais utilizados não marcaram as mesmas estruturas intracelulares, assumindo-se que isto acontece por não terem exactamente a mesma especificidade.

Através da utilização dos soros policlonais, a localização intracelular obtida para a proteína hsMob2 indica que a proteína de interesse tem uma localização dinâmica, estando presente em diferentes estruturas celulares ao longo do ciclo celular.

4.4. Imunolocalização da proteína de fusão GFP.hsMob2 ao longo do ciclo celular

Para se validarem os resultados obtidos por imunofluorescência, utilizou-se a técnica de imunolocalização da proteína de fusão Mob2GFP, de forma a se perceber se a localização celular seria a mesma nas duas técnicas.

Ao se utilizar esta técnica, para detecção intracelular da proteína de fusão GFP.Mob2, observou-se que esta se encontrava claramente localizada no corpo central (**Figura 22; Figura 23**)

Quando se observavam células em interfase existiam muitas estruturas esféricas marcadas pela proteína de fusão, localizadas no citoplasma. Embora essas estruturas aparentassem ser os centrossomas (forma esférica, muitas vezes aos pares, e perto do núcleo), não foi possível provar por dificuldades em incubar as células com anti- γ -tubulina.

Também foram identificadas umas outras estruturas, maiores do que as anteriores, esféricas ou em forma de arco. Pela sua distribuição nas células, pensou-se que estas estruturas fossem corpos centrais internalizados. Como a proteína MKLP-1 localiza no corpo central, através da incubação com anti-MKLP-1 foi possível confirmar que a proteína de fusão GFP.Mob2 localiza no corpo central internalizado (**Figura 24**)

4.5. Localização dinâmica da hsMob2

Os resultados obtidos mostraram que a proteína hsMob2 tem uma localização intracelular dinâmica, estando por isso presente em diferentes estruturas ao longo do ciclo celular. Para além da proteína hsMob2 ter uma localização dinâmica ao longo do ciclo celular, ainda fica conservada no interior do citoplasma, no corpo central internalizado. A localização da proteína hsMob2 parece ser contínua ao longo do ciclo, passando por diversas estruturas celulares. Na **Figura 1** pode-se ver uma representação esquemática do que se propõe ser a localização dinâmica da proteína hsMob2 na célula, embora nem todas as localizações

tenham sido confirmadas pela co-localização obtida pela marcação pelos anticorpos ACR40/ACR41 e pela localização da proteína de fusão.

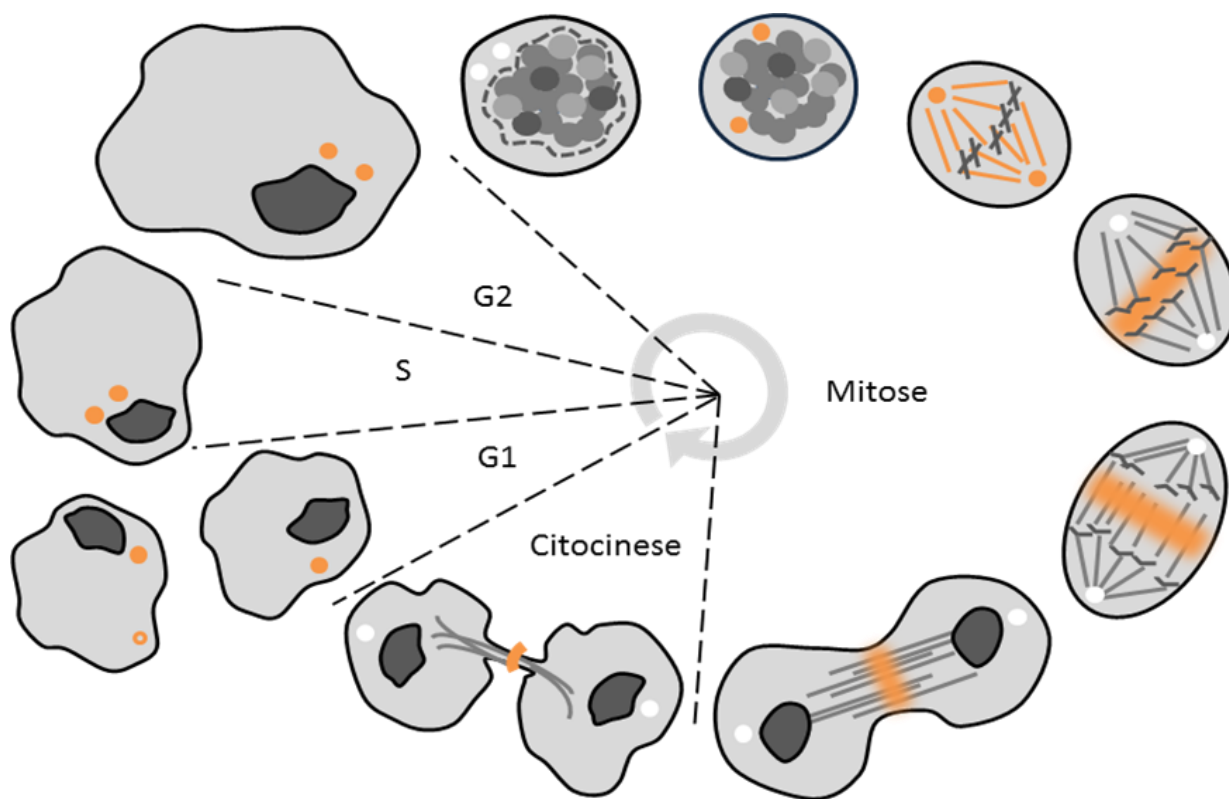


Figura 28 - Hipótese esquematizada da localização da proteína hsMob2 ao longo do ciclo celular. Localização do hsMob2 a laranja.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho deixam muitas questões em aberto sobre o hsMob2, não permitindo obter uma confirmação quanto à função do gene hsMob2. Por esse motivo, torna-se essencial a realização de ensaios de RNAi para imunofluorescência e para a obtenção de filmes de células vivas, de forma a perceber qual o comportamento dos centrossomas, na ausência de expressão da proteína hsMob2.

Como ferramenta de trabalho, também é essencial a produção de proteína hsMob2, de forma a se purificar os soros policlonais. Para este passo já foi feita a clonagem do hsMob2 no vector pENTR4, sendo o próximo passo a produção de proteína em Baculovírus.

Por fim, seria de interesse fazer uma linha celular estável, a qual expressasse a proteína de fusão GFP.hsMob2, de forma a se conseguir seguir o percurso intracelular desta proteína dinâmica, diminuindo todas as variáveis inerentes à transfecção transiente de DNA em células humanas.

6. BIBLIOGRAFIA

AMARAL, Nuno; *Regulação da Saída de Mitose em Células Humanas – A Função de hsMob1*; Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Departamento de Química e Bioquímica, **2010**.

ARIAS, Alfonso; STEWART, Alison; *Molecular Principles of Animal Development*, Oxford University Press, **2002**.

BAILLAT, Gilbert; MOQRICH, Abdelaziz; CASTETS, Francis; BAUDE Agnès; BAILLY, Yannick; BENMERAH, Alexandre; MONNERON, Ariane; *Molecular Cloning and Characterization of Phocin, a Protein Found from the Golgi Complex to Dendritic Spine*; *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 12, 663–673, **2001**.

BAKHOUM, Samuel; COMPTON, Duane; *Cancer: CINful Centrosomes*; *Current Biology*, Vol. 19, 642-645, **2009**.

BASERGA, Renato; *The Relationship of the Cell Cycle to Tumor Growth and Control of Cell Division: A Review*; *Cancer Res*; Vol. 25, 581-595, **1965**.

BANDIN, Allison; AMON, Angelika; *Men and Sin: What's the difference?*; *Nature Reviews – Molecular Cell Biology*; Vol. 2, 815-826, **2001**.

BARDIN, Allison; VISINTIN, Rosella; AMON, Angelika; *A Mechanism for Coupling Exit from Mitosis to Partitioning of the Nucleus*; *Cell*, Vol. 102, 21–31, **2000**.

BARTOLI, Marc; TERNAUX, Jean-Pierre; FORNI, Claude; PORTALIER, Paule; SALIN, Pascal; AMALRIC, Marianne; MONNERON, Ariane; *Down-Regulation of Striatin, a Neuronal Calmodulin-Binding Protein, Impairs Rat Locomotor Activity*; *Journal of neurobiology*, Vol. 40, 234-243, **1999**.

BOTHOS, John; TUTTLE, Robyn; OTTEY, Michelle; LUCA, Francis; HALAZONETIS, Thanos; *Human LATS1 Is a Mitotic Exit Network Kinase*; *Cancer Res*, Vol. 65, 6568-6575, **2005**.

BURKARD, Mark; RANDALL, Catherine; LAROCHELLE, Stéphane; ZHANG, Chao; SHOKAT, Kevan; FISHER, Robert; JALLEPALLI, Prasad; *Chemical genetics reveals the requirement for Polo-like kinase 1 activity in positioning RhoA and triggering cytokinesis in human cells*; PNAS, Vol. 104, 4383-4388, **2007**.

CLUTE, Paul; PINES, Jonathon, *Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase*, Nature Cell Biology, Vol.1, 82-87, **1999**.

COOPER, Geoffrey; *The Cell: A Molecular Approach*; 2º Edição, **2000**.

DOYU, Manabu; SAWADA, Ko-ichi; MITSUMA, Norimasa; NIWA, Jun-ichi; YOSHIMOTO, Makoto; FUJII, Yasuyuki; SOBUE, Gen; KATO, Kikuya; *Gene expression profile in Alzheimer's brain screened by molecular indexing*; Molecular Brain Research, Vol. 87, 1-11, **2010**.

EDGAR, Bruce; *From Cell Structure to Transcription: Hippo Forges a New Path*; Cell, Vol. 124, 267-273, **2006**.

EMRE, Doruk; TERRACOL, Régine; PONCET, Anaïs; RAHMANI, Zohra; KARESS, Roger; A mitotic role for Mad1 beyond the spindle checkpoint; Journal of Cell Science, Vol. **124**, 1664-1671, **2011**.

ENSERINK, Jorrit; KOLODNER, Richard; *An overview of Cdk1-controlled targets and processes*; Cell Division, Vol. 5, **2010**.

GALLANT, Paul; NIGG, Erich; *Cyclin B2 undergoes cell cycle-dependent nuclear translocation and, when expressed as a non-destructible mutant, causes mitotic arrest in HeLa cells*, J Cell Biol., Vol. 117, 213–224, **1992**.

GUIZETTI, Julien; GERLICH, Daniel; *Cytokinetic abscission in animal cells*; Seminars in Cell & Developmental Biology, Vol. 21, 909-916, **2010**.

HAMMARTON, Tansy; LILICO, Simon; WELBURN, Sue; MOTTRAM, Jeremy; *Trypanosoma brucei Mob1 is required for accurate and efficient cytokinesis but not for exit from mitosis*. Mol. Microbiol, Vol. 56, 104-116, **2005**.

HERGOVICH, Alexander; KOHLER, Reto; SCHMITZ, Debora; VICHALKOVSKI, Anton; CORNILS, Hauke; HEMMINGS, Brian; *The MST1 and Hmob1 Tumor Suppressors Control Human Centrosome Duplication by Regulation of NDR Kinase Phosphorylation*; Current Biology, Vol. 19, 1692-1702, **2009**.

HERGOVIC, Alexander; *MOB control: Reviewing a conserved family of kinase regulators*; Cellular Signalling, Vol. 23, 1433–1440, **2011**.

KOPS, Geert; SAURIN, Adrian; MERALDI, Patrick; *Finding the middle ground: how kinetochores power chromosome congression*; Cell. Mol. Life. Sci., Vol. 67, 2145-2161, **2010**.

KOMARNITSKY, Svetlana; CHIANG, Yueh-Chin; LUCA, Francis; CHEN, Junji; TOYN, Jeremy; WINEY, Mark; JOHNSTON, Leland; DENIS, Clyde; *DBF2 protein Kinase Binds to and Acts through the Cell Cycle-Regulated MOB1 Protein*; Molecular and Cellular Biology, Vol. 18, 2100-2107; **1998**.

KUBIAK, Jacek; CIEMERYCH, Maria; HUPALOWSKA, Anna; POLACZEK, Marta; POLANSKI, Zbigniew; *On the transition from the meiotic to mitotic cell cycle during early mouse development*; Int. J. Dev. Biol., Vol. 52, 201-217, **2008**.

LAI, Zhi-Chun; WEI, Xiaomu; SHIMIZU, Takeshi; RAMOS, Edward; ROHRBAUGH, Margaret; NIKOLAIDIS, Nikolas; Ho, LI-LUN; Li, YING; Control of Cell Proliferation and Apoptosis by Mob as Tumor Suppressor, Mats; Cell, Vol. 120, 675–685, **2005**.

LIU, Ling-Yu; LIN, Cheng-Han; FAN, Seng-Sheen; *Function of Drosophila mob2 in photoreceptor morphogenesis*; Cell Tissue Res, Vol. 338, 377-389, **2009**.

LUCA, Francis; WINEY, Mark; *MOB1, an essential yeast gene required for completion of mitosis and maintenance of ploidy*; Molecular Biology of the Cell, Vol. 9, 29-46, **1998**.

LUCA, Francis; MODY, Manali; KURISHKO, Cornelia; ROOF, David; GIDDINGS, Thomas; WINEY, Mark; *Saccharomyces cerevisiae Mob1p is required for cytokinesis and mitotic exit*; Mol. Cell Biol.; Vol. 21, 6972-6983, **2001**.

MATULIENE, Jurgita; KURIYAMA, Ryoko; *Kinesin-like protein CHO1 is required for the formation of midbody matrix and the completion of cytokinesis in mammalian cells*. Mol. Biol. Cell, Vol. 13, 1832-1845, **2002**.

MISHIMA, Masanori; KAITNA, Susanne; GLOTZER, Michael; *Central Spindle Assembly and Cytokinesis Require a Kinesin-like Protein/RhoGAP Complex with Microtubule Bundling Activity*; Developmental Cell, Vol. 2, 41–54, **2002**.

MORENO, Carlos; LANE, William; PALLAS, David; *A Mammalian Homolog of Yeast MOB1 Is Both a Member and a Putative Substrate of Striatin Family-Protein Phosphatase 2A Complexes*; Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, 24253-24260, **2001**.

MOORE, Jonathan; KIRK, Jane; HUNT, Tim; *Unmasking the S-Phase-Promoting Potential of Cyclin B1*; Science, Vol 300, 987-990, **2003**.

PINES, Jonathon; *Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C*; Nature Reviews, Molecular Cell Biology, Vol.12, 427-438, **2011**.

PRZEWLOKA, Marcin; GLOVER, David; *The Kinetochore and the Centromere: A Working Long Distance Relationship*; Annu. Rev. Genet., Vol. 43, 439-465, **2009**.

SAMBROOK, Joseph, RUSSEL, David; *Molecular Cloning, A laboratory manual*; **2001**.

SAMORA, C; *Via de saída de mitose em Drosophila melanogaster: análise de mutantes nos genes tipo MOB*; Faculdade de Ciências. Mestrado em Biologia Molecular e Genética. Universidade de Lisboa. **2007**.

SAGONA, Antonia; STENMARK, Harald; *Cytokinesis and cancer*; FEBS Letters, Vol. 584, 2652-2661; **2010**.

SKIBBENS, Robert; HIETER, Philip; *Kinetochores and the checkpoint mechanism that monitors for defects in the chromosome segregation machinery*, *Annu. Rev. Genet.*, Vol. 32, 307–337, **1998**.

SCHATTEN, Heide; *The mammalian centrosome and its functional significance*; *Histochem Cell Biol*; Vol. 129, 667-686, **2008**.

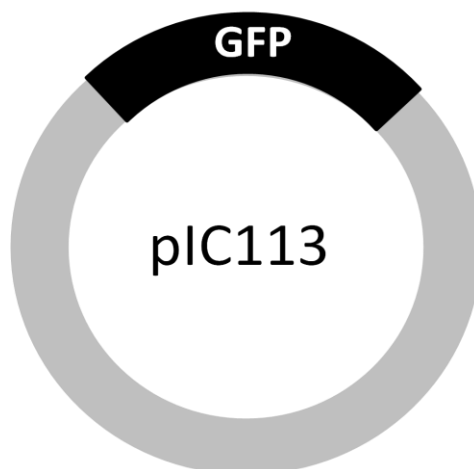
VITULO, Nicola; VEZZI, Alessandro; GALLA, Giulio; CITTERIO, Sandra; MARINO, Giada; RUPERTI, Benedetto; ZERMIANI, Monica; ALBERTINI, Emidio; VALLE, Giorgio; *Characterization and Evolution of the Cell Cycle-Associated Mob Domain-Containing Proteins in Eukaryotes*; *Evolutionary Bioinformatics*, Vol. 3, 121–158, **2007**.

WEISS, Eric; KURISCHKO, Cornelia; ZHANG, Chao; SHOKAT, Kevan; DRUBIN, David; LUCA, Francis; *The Saccharomyces cerevisiae Mob2p-Cbk1p kinase complex promotes polarized growth and acts with the mitotic exit network to facilitate daughter cell-specific localization of Ace2p transcription factor*, *The Journal of Cell Biology* , Vol. 158, 885-900, **2002**.

WILMETH, Lori; SHRESTHA, Sanjay; MONTAN, Gilbert; RASHE, Jennifer; SHUSTER, Charles; *Mutual Dependence of Mob1 and the Chromosomal Passenger Complex for Localization during Mitosis*; *Molecular Biology of the Cell*; Vol. 21, 380–392, **2010**.

7. ANEXOS

7.1. Clones de DNA

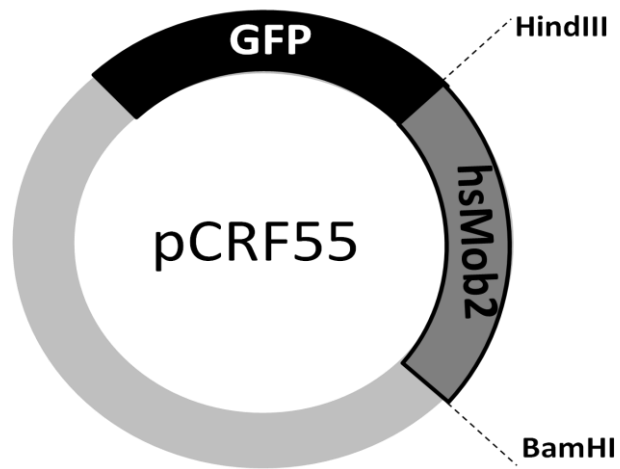


```

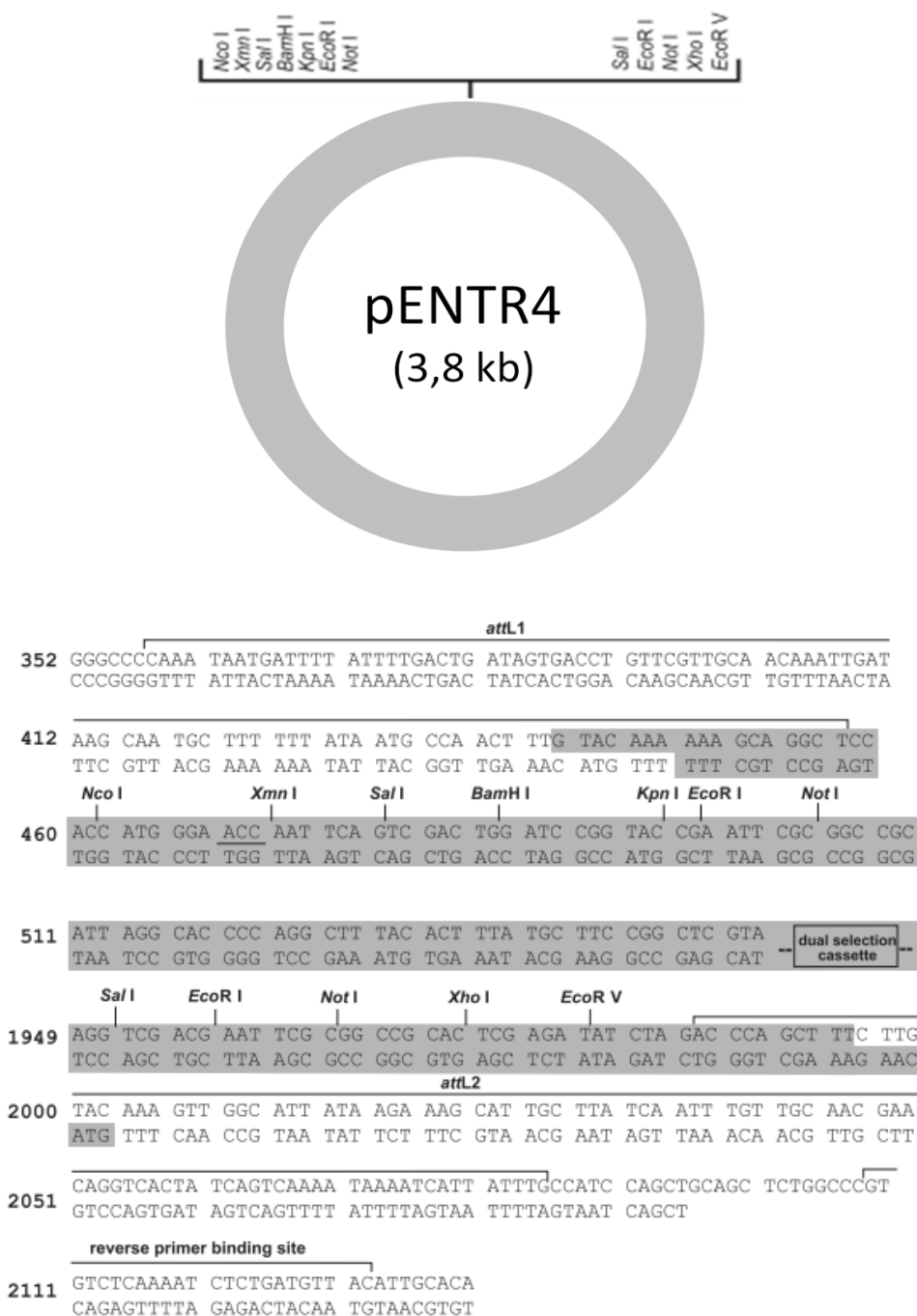
GTGCTARACRACCTCCGCCCATTTGACGCAARTGGGCGGTAGGCGGTGTACGGTGGGAGGCTCTATATAGCAGAGCTGGTTTA
AfeI
GTGARACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGTCCGCCACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC
M V S K G E E L F T
GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC AGC GTG
G V V P I L V E L D G D V N G H K F S V
TCC GGC GAG GGC GAG GGC GAT GCC ACC TAC GGC AAG CTG ACC CTG AAG TTC ATC TGC ACC
S G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T
ACC GGC AAG CTG CCC GTG CCC TGG CCC ACC CTC GTG ACC ACC CTG ACC TAC GGC GTG CAG
T G K L P V P W P T L V T T L T Y G V Q
TGC TTC AGC CGC TAC CCC GAC CAC ATG AAG CAG CAC GAC TTC TTC AAG TCC GCC ATG CCC
C F S R Y P D H M K Q H D F F K S A M P
GAR GGC TAC GTC CAG GAG CGC ACC ATC TTC TTC AAG GAC GAC GGC AAC TAC AAG ACC CGC
E G Y V Q E R T I F F K D D G N Y K T R
GCC GAG GTG AAG TTC GAG GGC GAC ACC CTG GTG AAC CGC ATC GAG CTG AAG GGC ATC GAC
A E V K F E G D T L V N R I E L K G I D
TTC AAG GAG GAC GGC AAC ATC CTG GGG CAC AAG CTG GAG TAC AAC TAC AAC AGC CAC AAC
F K E D G N I L G H K L E Y N Y N S H N
GTC TAT ATC ATG GCC GAC AAG CAG AAG AAC GGC ATC AAG GTG AAC TTC AAG ATC CGC CAC
V Y I M A D K Q K N G I K V N F K I R H
AAC ATC GAG GAC GGC AGC GTG CAG CTC GCC GAC CAC TAC CAG CAG AAC ACC CCC ATC GGC
N I E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I G
GAC GGC CCC GTG CTG CTG CCC GAC AAC CAC TAC CTG AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC AAA
D G P V L L P D N H Y L S T Q S A L S K
GAC CCC AAC GAG AAG CGC GAT CAC ATG GTC CTG CTG GAG TTC GTG ACC GCC GGG ATC
D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I
BspEI NotI
ACT CTC GGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG TCC GGA GGG GAT CGG TGG AGC TCC ACC GGT GGC
T L G M D E L Y K S G G D R W S S T G G
XbaI
GGC CGC TCT AGA GAG AAT CTT TAT TTT CAG GGC GCC GCC AAA TTC AAA GAA ACC GCT GCT
G R S R E N L Y F Q G A A K F K E T A A
SpeI XhoI HindIII
GCT AAA TTC GAA CGC CAG CAC ATG GAC AGC GGA GGT GGA GGT ACT AOT CTC GAG CTC AAG
A K F E R Q H M D S G G G G T S L E L K
EcoRI PstI Sall SacII SmaI BamHI XbaI
CTT CGA ATT CTG CAG TCG ACG GTA CCG CGG GCC CGG GAT CCA CCG GAT CTA GAT AA CTGAT
L R I L Q S T V P R A R D P P D L D N
MfeI
CAATATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGTCTTTAAAAAACCTCCCRACCTCCCCCTGACCTGAACATA
AATGAATGCARTTGTGTGTTTACTTGTATTATTCACGCTTATATGGTTACCAARTAAAGCARTAGCAT

```

pIC113 – O vector pIC113 baseia-se no vector pEGFP-C1 (Clontech) e foi gentilmente cedido por Iain Cheeseman (Cheeseman and Desai, 2005). Imagem da sequência do vector pIC113 adaptada de Cheeseman and Desai, 2005. Verde, pEGFP; Azul, local de clivagem TEV; Azul claro, péptido S; Resistente à kanamicina. Com exceção da XbaI, todas as enzimas de restrição assinaladas só cortam uma vez no vector.



pCRF55 – O fragmento contendo o gene *hsMob2* foi subclonado e inserido no vetor pIC113. Por restrição obtêm-se uma banda de 700pb e uma banda de 5.5pb. Resistente à kanamicina.



pENTRY4 – Vector utilizado para a clonagem do gene *hsMob2*. Resistente à kanamicina. Invitrogene®.