

Seyar Ablyazizov

Estudo da função das proteínas MOB1 e ASPM na progressão da mitose

Dissertação do Mestrado

Oncobiologia – Mecanismos Moleculares do Cancro



Universidade do Algarve

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2017

Seyar Ablyazizov

Estudo da função das proteínas MOB1 e ASPM na progressão da mitose

**Mestrado em Oncobiologia –
Mecanismos Moleculares do Cancro**

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Professor Doutor Álvaro Tavares



Universidade do Algarve

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2017

Título do trabalho: “Estudo da função das proteínas MOB1 e ASPM na progressão da mitose”

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright Seyar Ablyazizov

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer o Professor Doutor Álvaro Tavares por me ter recebido e orientado da melhor forma possível neste trabalho. Pelo apoio, paciência, motivação, disponibilidade e atenção que me deu durante este ano. Pela partilha de conhecimento científico, conselhos e também por conversas durante café sobre os diversos assuntos.

A Cláudia Florindo pelo apoio, disponibilidade e atenção durante este ano. Por me ter ensinado todos os aspetos práticos do laboratório.

Quero agradecer meus pais pelo apoio que me deram durante estes anos. Por terem acreditado em mim. Sem eles eu não estaria aqui hoje e não seria o que sou.

Ao meu “squad”: Davide Nascimento, Tiago Silva, Sara Sequeira, Ana Fonseca e Ana Alvinas por toda a amizade, apoio, motivação, jantares e conversas. A todos um grande e enorme obrigado!

Resumo

Os genes da família MOB (*Mps One Binder*) são muito conservados entre as espécies. A quantidade de genes MOBs aumenta com a complexidade dos organismos. Por exemplo, em leveduras há dois tipos de MOB enquanto em humanos há sete MOBs diferentes. Neste estudo focamos no gene MOB1.

O MOB1 é o supressor tumoral que tem duas proteínas distintas MOB1A e MOB1B com homologia de 95%. O MOB1 faz parte da via Hippo que é a reguladora do crescimento dos órgãos. Além disso, o MOB1 faz parte da via MEN (*Mitotic Exit Network*) que força as células sair da mitose e promove a correta divisão celular (citocinese).

Todos os trabalhos feitos à volta do MOB1 consideram MOB1A e MOB1B como as proteínas com funções idênticas. Os trabalhos do nosso laboratório, por RNAi, mostram que MOB1A e MOB1B têm algumas funções em comum e outras funções específicas de cada um deles.

Para aprofundar os estudos e dada a penetrância incompleta dos ensaios por RNAi, torna-se necessário obter linhas celulares sem os genes de MOB1A e/ou MOB1B (clones nulos). Neste trabalho foi usada a tecnologia CRISPR/Cas9 com a inserção da sequência de interesse (HDR) pela recombinação homologa para criar os clones nulos do MOB1. Foram identificados clones nulos (desativação dos dois alelos) e heteroalelicos (desativação de um alelo) dos MOB1A e MOB1B com abordagem por PCR. A análise das linhas nulas permitiu observar diferentes fenótipos para MOB1A e MOB1B. A imunofluorescência realizada nos clones nulos e heteroalelicos permitiu identificar as pontes de cromatina entre as células e identificar células gigantes. Estas observações confirmam divisões incompletas e má segregação cromossômica. Além disso, foram confirmados os resultados obtidos do trabalho anterior das células tratadas com RNAi para MOB1A e/ou MOB1B.

Em conclusão, este trabalho permitiu descobrir as possíveis funções dos MOB1A e MOB1B que regulam os *checkpoints* do ciclo celular, que afetam a estabilidade do fuso mitótico e progressão da citocinese.

Índice

Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iii
Índice.....	iv
Índice de Ilustrações.....	vi
Lista de Abreviaturas	viii
1. Introdução.....	1
1.1. Ciclo celular.....	1
1.1.1. Interfase.....	1
1.1.2. Mitose	1
1.1.3. Citocinese.....	2
1.1.4. Regulação do ciclo celular.....	2
1.1.4.1. Regulação por ciclinas e CDKs (cycline dependent kinases).....	2
1.1.4.2. Regulação por APC (anaphase promoting complex)	4
1.1.4.3. Regulação por CPC (Chromosomal Passenger Complex)	5
1.1.4.4. Regulação por checkpoints (Pontos de controlo)	6
1.2. Mitotic Exit Network (MEN)	8
1.3. A via Hippo.....	11
1.3.1. Semelhança entre via Hippo e via MEN.....	14
1.4. A família dos MOBs.....	15
1.5. Estudo do gene ASPM.....	17
1.6. Engenharia genética.....	18
2. Materiais e Métodos	25
2.1. Congelamento das células.....	25
2.2. Manutenção das linhas celulares	26
2.3. Descongelamento das células	27
2.4. Preparação de lisados proteicos	27
2.5. Extração e purificação do DNA.....	28
2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida e Western blotting.....	29
2.7. Miniprep dos plasmídeos e extração do DNA de agarose.....	33
2.8. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	33
2.9. Eletroforese em gel de agarose	36
2.10. Imunofluorescência das células.....	36

2.10.1. Fixação em Metanol/Acetona	36
2.10.2. Fixação em formaldeído	37
2.11. Dissecção dos cérebros das larvas de <i>Drosophila melanogaster</i>	37
2.12. Passagem de moscas.....	38
2.13. Imunofluorescência dos cérebros de <i>Drosophila melanogaster</i>	39
3. Resultados.....	40
3.1. Análise dos clones CRISPR de MOB1A e MOB1B	40
3.2. Análise dos clones CRISPR do MOB1A.....	40
3.2.1. Determinação do local de inserção do HDR no MOB1A.....	46
3.3. Análise dos clones CRISPR do MOB1B.....	47
3.3.1. Determinação do local de inserção do HDR no MOB1B	52
3.4. Confirmação dos gRNA por sequenciação.....	52
3.4.1. Sequenciação dos gRNA.....	52
3.5. Alteração do nível proteico do MOB1.....	54
3.6. Imunofluorescência dos clones CRISPR	55
3.7. Aplicação da tecnologia CRISPR na deleção dos genes MOB1A e MOB1B na linha RPE-I	61
3.8. Resultados obtidos do ASPM	63
4. Discussão.....	66
5. Conclusão	71
6. Bibliografia.....	72
7. Anexos.....	82

Índice de Ilustrações

Figura 1.1. Variação da concentração das ciclinas.....	3
Figura 1.2. Regulação da anafase e saída da mitose por APC-Cdc20	5
Figura 1.3. Regulação de segregação dos cromossomas por SAC.....	8
Figura 1.4. Desalinhamento do fuso provoca a quebra na assimetria do Tem1 no corpo do fuso polar.....	10
A comparação dos componentes da via Hippo entre mamíferos e Drosophila.....	11
Figura 1.6. Regulação da via Hippo.....	13
Figura 1.7. Possíveis manipulações de DNA com Cre-lox.....	19
Figura 1.8. Esquema simplificada de tipos de reparação do DNA	20
Figura 1.9. Representação do Zinc Fingers Nucleases.....	21
Figura 1.10. A TAL effector nuclease.....	21
Figura 1.11. Sistema CRISPR/Cas9.....	23
Figura 2.1. Contagem das células na câmara de Neubauer.....	26
Figura 2.2. Montagem de uma sandwich da transferência no tanque.....	31
Figura 2.3. Dissecção da larva de D. melanogaster.....	38
Figura 3.1. Representação gráfica dos locais da região genómica do MOB1A.....	41
Figura 3.2. PCR dos clones RFA isolados pelo Ricardo Furtado com os primers RF1 e RF2.....	41
Figura 3.3. PCR dos clones RFA selecionados com os primers RF1 e RF2.....	42
Figura 3.4. PCR dos clones RFA (110, 111, 112, 115, 118).....	43
Figura 3.5. PCR do clone RFA 118	43
Figura 3.6. PCR dos clones RFA isolados pela Cláudia Florindo	44
Figura 3.7. Representação esquemática do local no genoma do MOB1A onde o HDR se insere.....	45
Figura 3.8. PCR do clone RFA 2.....	46
Figura 3.9. Resultado da sequenciação do produto do PCR do clone RFA2.....	47
Figura 3.10. Representação gráfica da região genómica do Mob1B.....	47
Figura 3.11. PCR dos clones RFB selecionados por Ricardo Furtado.....	48
Figura 3.12. PCR dos clones RFB (102, 107, 109, 110, 111, 114).....	49
Figura 3.13. PCR dos clones RFB dos clones isolados pela Cláudia Florindo.....	50
Figura 3.14. Representação do local no genoma do Mob1B.....	50
Figura 3.15. PCR dos clones RFB (5, 7, 17, 18, 21, 111, 123).....	51
Figura 3.16. Resultado da sequenciação do produto do PCR do clone RFB 123.....	52
Figura 3.17. A esquema do plasmídeo do CRISPR da SCBT.....	53
Figura 3.18. O Western-Blot dos clones RFA2, RFB17 e RFB123.....	54

Figura 3.19. Diferença entre marcação direta e indireta.	56
Figura 3.20. Visualização das colônias da pequena dimensão.....	56
Figura 3.21. Comparação da média de taxa de proliferação dos clones RFA2 e RFB123	57
Figura 3.22. Comparação do índice mitótico dos clones RFA2, RFB17 e RFB123.....	58
Figura 3.23. Deleção de MOB1A ou de MOB1B aumenta o número das células multinucleadas.....	59
Figura 3.24. Deleção de MOB1A ou de MOB1B aumenta o número das células com os micronúcleos	59
Figura 3.25. Deleção de MOB1A ou de MOB1B aumenta o número das células com as pontes de cromatina	60
Figura 3.26. Deleção do MOB1A ou de MOB1B leva ao aparecimento das células gigantes	61
Figura 3.27. Curva de sobrevivência das células RPE-I	62
Figura 3.28. Dozes pequenas de puromicina influenciam o tamanho das células RPE-I	62
Figura 3.29. Representação esquemática do genoma da Drosophila do gene ASP.	63
Figura 3.30. As deleções no gene ASP causam a microcefalia nas moscas	64
Figura 3.31. Confirmação da deleção do ASP nos mutantes de Drosophila.....	65
Figura 4.1. Formação de células gigantes e multinucleadas	69
Figura 7.1. Análise por Western-Blot dos clones RFA2, RFB123 e RFB17.....	82

Lista de Abreviaturas

A

Amot – Angiomotin
ASP – Abnormal spindle protein
ASPM - Abnormal Spindle-like
Microcephaly Associated
APC - Anaphase promoting complex

B

Bns1 - Bypasses need for Spo12p
Bub1 - Budding uninhibited by
benzimidazol 1
Bub3 - Budding uninhibited by
benzimidazol 3
BubR1 - Budding uninhibited by
benzimidazol 1 homolog beta (Yeast)

C

CAK – CDK-activating kinase
Cbk1 - Cell wall biosynthesis kinase 1
CDK – cycline dependent kinases
Cdc - Cell division cycle
Cdh1 - Cadherin 1, E-Cadherin (Epithelial)
CENPJ - Centromere Protein J
Chk1 - Checkpoint Kinase 1
Chk2 – Checkpoint Kinase 2
CRISPR - Clustered regularly interspaced
short palindromic repeats
CPC - Chromosomal Passenger Complex
Cyk3 - Cytokinesis 3

D

Dbf2 - Dumbbell Former 2
DBS – Double-strand break
dH₂O – Água destilada
DMEM - Dulbecco's modified Eagle
medium
DNA - Deoxyribonucleic acid

E

EB1 - End-binding protein 1
EGF - Epidermal growth factor

F

Fob1 - Fork blocking less 1

G

GAP - GTPase-activating protein
gRNA – Guide RNA

H

HDR – Homology direct repair
Hof1 - Homolog of Cdc15

I

INCENP - Inner centromere protein
Inn1 - Required for ingression 1

K

Kin4 – Kinase 4

L

Lats1/2 - Large tumor suppressor 1 and 2
Lte1 - Low temperature essential 1

M

Mad1 – Mitotic arrest deficient 1
Mad2 - Mitotic arrest deficient 2
MCC – Mitotic checkpoint complex
MEN – Mitotic exit network
MOB – Mps1 binder
Mps – Monopolar spindle like protein 1
MPF - Mitosis promoting factor
Mrc1 - Mediator of the replication
checkpoint
Mst1/2 - Mammalian Sterile 20-like 1 and 2

N

Ndr1/2 - Nuclear Dbf2-related kinase 1 and 2
Net1 - Neuroepithelial cell transforming 1
Nf2 - Neurofibromatosis 2
NHEJ – Non-homologous end joining

P

PAM - Protospacer adjacent motif
PBS - Phosphate-buffered saline
PCR - Polymerase chain reaction
pH – Potencial de hidrogénio
Plk1 – Polo-like kinase 1
PLK1 - Polo-like kinase 1
PP2A - Protein phosphatase 2
PVDF - Polyvinylidene difluoride

R

rDNA - Ribosomal DNA
RENT - Regulator of nucleolar silencing and telophase
Rho1 - Ras homolog 1
RNAi - Ribonucleic acid interference
RVD - Repeat-variable di-residue

S

SAC - Spindle assembly checkpoint
SAH - Single α -helix
Sd - Scalloped
SDS - Sodium dodecyl sulfate
SIN – Septation initiation network
Slk19 - Synthetic lethal kar3p
Spo12 – Sporulation 12
SPB - Spindle polar body
Swi5 - Switching deficient 5

T

TAE – Tampão Tris-acetate-EDTA
TAL - Transcription activator–like
TALEN - Transcription activator-like effector nucleases
Taz – Tafazzin
TEAD - TEA domain transcription factor
Tem1 - Termination of M phase 1
Trc – Tricornered

V

VGL4 - Vestigial like family member 4

W

WD62 - WD repeat-containing protein 62

Y

Yap - Yes associated protein
Yki – Yorkie

Z

ZFN - Zinc fingers nucleases

1. Introdução

1.1. Ciclo celular

O ciclo celular é constituído por vários processos necessários para sucessiva divisão celular. Para se dividir em duas células filhas, a célula mãe tem de completar as tarefas metabólicas e duplicar os componentes do qual mais importante é a genoma. A interfase, mitose e citocinese são três períodos do ciclo celular.

1.1.1. Interfase

Durante a interfase a células cresce e copia o seu DNA. A interfase é dividida em três fases. A primeira fase é a fase G1 e nesta fase a célula cresce fisicamente, aumenta a quantidade dos organelos e prepara o material necessário para os passos posteriores [1]. Na segunda fase, fase S, ocorre a duplicação do DNA, ou seja, fazendo com que cada cromossoma passe a ser constituído por dois cromátídeos irmãos. Além disso ocorre a duplicação da estrutura organizadora de microtúbulos chamada centrossoma e inicia o seu movimento para os polos da célula [1]. O centrossoma ajuda a separar os cromátídeos na mitose. Na terceira fase, G2, ocorre uma grande síntese proteica e separação dos centrossomas devido as proteínas motoras, dineínas que se ligam aos microtúbulos dos centrossomas e empurrem para os lados opostos [1].

1.1.2. Mitose

Quando acaba a interfase começa a mitose onde ocorre a divisão nuclear. A mitose distingue-se em varias fases. Na primeira fase, na prófase ocorre condensamento dos cromossomas e os cromátídeos irmãos que foram replicados. Os cromátídeos irmãos continuam ligados num ponto chamado centrómero. Nesta fase da mitose (prófase) ainda ocorre a formação dos fusos mitóticos por centrossomas. Após a formação dos fusos mitóticos a membrana nuclear que envolve o núcleo é quebrada e o DNA não está mais separado do citoplasma [1]. As formações das proteínas chamadas de cinetócoros forma a volta do centrómero. O fuso mitótico estende-se dos polos e liga-se aos cinetócoros. Estes eventos ocorrem na prometáfase, uma fase do ciclo celular que ocorre entre prófase e metafase. A segunda fase do ciclo celular é a metafase. Nesta fase os microtúbulos puxam os cromátídeos irmãos de um lado para o outro até se alinharem em um plano, chamado plano equatorial no

centro da célula [1]. Na terceira fase, na anafase, os cromátídeos irmãos são separados simultaneamente por seus centrómeros. Os cromossomos separados são então puxados pelo fuso para polos opostos da célula [1]. A anafase garante que cada célula filha receba um conjunto idêntico de cromossomos. Finalmente, na última fase do ciclo celular, na telofase, forma-se uma membrana nuclear a volta de cada conjunto de cromossomos para separar o DNA nuclear do citoplasma. Os cromossomos começam a desenrolar, o que os torna difusos e menos compactos [1]. Junto com a telofase, a célula sofre um processo separado chamado citocinese que divide o citoplasma da célula parental em duas células filhas.

1.1.3. Citocinese

A citocinese é o processo físico da divisão celular, que divide o citoplasma de uma célula parental em duas células filhas e executa um processo essencial para separar a célula em metade e garantir que um núcleo acaba em cada célula filha [2]. A citocinese começa no final da anafase e continua através da telofase. Um anel de filamentos proteicos chamado de anel contrátil que se forma a volta do “equador” da célula junto da membrana plasmática no interior da célula. O anel contrátil encolhe no equador da célula, comprimindo a membrana plasmática para dentro e formando o que é chamado de sulco de clivagem (*cleavage furrow*). Eventualmente, o anel contrátil encolhe até o ponto de haver duas células separadas, cada uma associada à sua própria membrana plasmática [2].

1.1.4. Regulação do ciclo celular

1.1.4.1. Regulação por ciclinas e CDKs (cycline dependent kinases)

O ciclo celular tem de ser extremamente regulado, pois uma falha em seus processos pode levar a célula a entrar em apoptose e até gerar células tumorais. As células tumorais são células anormais que se dividem numa maneira não controlada e até se podem espalhar para outros tecidos. Por esse motivo, células eucarióticas apresentam uma série de mecanismos que impedem divisões celulares incontroláveis e reparam danos no material genético.

A progressão das células no ciclo celular é controlada pelas ciclinas que ativam as enzimas cinases dependentes da ciclina (CDK) [1]. As ciclinas não têm função enzimática, mas possuem os locais de ligação que guiam os CDK aos locais subcelulares. Em humanos existe treze CDKs, dos quais os quatro principais são: CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6. Durante o ciclo celular a concentração de CDKs não varia muito, mas a concentração de ciclinas varia [1]. As ciclinas formam complexos com CDKs, que começa a ativar o CDK a qual estão ligados, mas

a ativação completa também requer a fosforilação pela cinase ativadora de CDK (CAK) [1]. A formação do complexo e ativação pela CAK resulta na ativação completa do CDK.

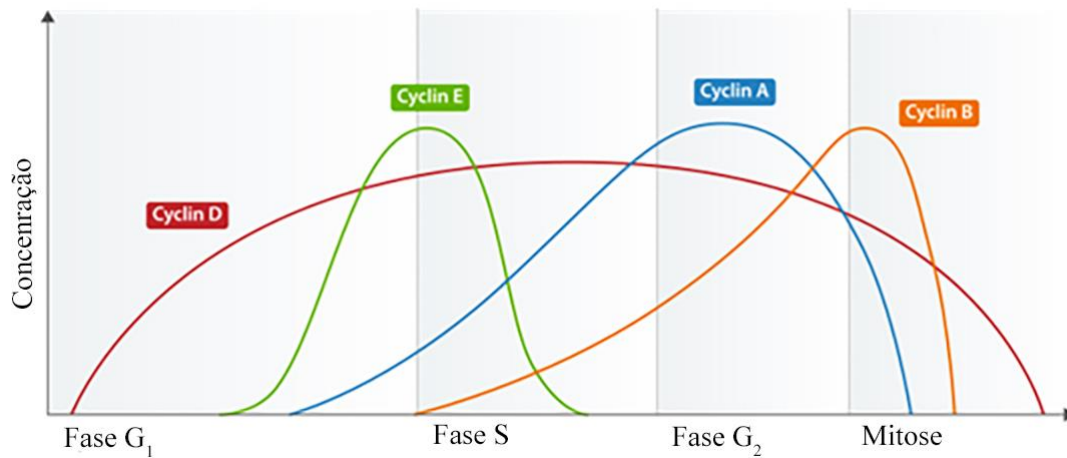


Figura 1.1. Variação da concentração das ciclinas durante o ciclo celular. O vermelho é a concentração da ciclina D. O verde é a concentração da ciclina E. O azul é a concentração da ciclina A. O cor-de-laranja é a concentração da ciclina B.

As ciclinas podem ser divididas em quatro classes com base no seu comportamento no ciclo celular de células somáticas de vertebrados: ciclinas D, ciclinas E, ciclinas A e ciclinas B [1]. Ciclinas E aumentam no final do G₁ e diminuem no início da fase S (fig. 1.1). O complexo CDK2-ciclina E começa a induzir os processos iniciais da replicação do DNA, principalmente pelo bloqueio de sistemas que impedem a atividade de CDK da fase S em G₁ [1]. As ciclinas também promovem outras atividades para o ciclo celular avançar, como a duplicação de centrôssomas. As ciclinas D não se comportam como as outras ciclinas, na medida em que as concentrações aumentam gradualmente, ao longo do ciclo celular com base no crescimento celular e nos sinais externos da regulação do crescimento (fig. 1.1). A presença das ciclinas D coordena o crescimento celular com a entrada para um novo ciclo celular. As ciclinas A ligam-se a CDK2 e o complexo induz diretamente a replicação do DNA. O nível das ciclinas A permanece elevado, não só em toda a fase S, mas também no G₂ e mitose precoce, para promover os primeiros eventos da mitose (fig. 1.1) [1]. As concentrações de ciclina B aumentam à medida que a célula começa a entrar na mitose e as concentrações atingem o pico na metáfase (fig. 1.1). As alterações das células no ciclo celular, como a montagem de fuso mitótico e o alinhamento de cromátídeos irmãos ao longo dos eixos, são induzidas por complexos de CDK1-ciclina B [1]. O complexo CDK1-ciclina B é chamado como o *mitosis promoting factor* (MPF). Para a célula conseguir sair da mitose é necessário a inativação do complexo MPF que tem o início durante a anáfase.

1.1.4.2. Regulação por APC (*anaphase promoting complex*)

A progressão do ciclo celular é controlada por degradação proteica dos reguladores específicos nos estádios específicos do ciclo. Um dos primeiros complexos descritos que regula a degradação dos componentes do ciclo celular foi o complexo promotor de anafase (APC). O processo de degradação por APC é feito por ubiquitinação. A ubiquitinação envolve a ubiquitina que é transferida de uma enzima ativadora da ubiquitina (E1), para a enzima que conjuga a ubiquitina (E2), e finalmente para o substrato [3]. A ligação final de ubiquitina para o substrato é feita por ubiquitina ligase E3 neste caso o APC. Após a ligação de substrato com ubiquitina a degradação ocorre por proteasoma 26S [4].

O APC é composto por cerca de 12 subunidades. Os co-fatores que regulam atividade do APC durante o ciclo celular são Cdc20 (*cell division cycle 20*) e Cdh1 (E-Cadherin) [4]. Os CDKs e APC regulam um a outro durante o ciclo celular. O Cdc20 só associa-se ao APC quando os subunidades do segundo estão fosforilados por cinases mitóticas CDK1 ou Plk1 (*Polo-like kinase 1*) [4]. Por outro lado, a interação do Cdh1 não depende da fosforilação do APC. Durante fase S, G2 e início da mitose a fosforilação do Cdh1 por CDK1 ou CDK2 prejudica a interação deste com o APC até os últimos estádios da mitose. Assim, a atividade dos CDKs determinam a atividade do APC: ativado por Cdc20 durante início e no meio da mitose por causa da grande atividade dos CDKs, ou ativada por Cdh1 durante saída da mitose e fase G1 devido a baixa atividade de CDKs. Por outro lado, o APC controla atividade dos CDKs marcando as ciclinas A (durante transição G2/M) ou ciclinas B (durante a transição metafase/anafase) para degradação (fig 1.1) [5].

Uma das funções mais conhecidas e possivelmente mais importantes do APC, e de onde este complexo tem o nome “APC”, é promover anafase. Para haver segregação dos cromossomas tem que haver a degradação das coesinas que ligam os cromátídeos irmãos (fig. 1.2). Durante a metafase o APC-Cdc20 ubiquitila securina, que é o inibidor da separase (protéase que degrada a coesinas). Após degradação da securina a separase fica ativada e degrada as coesinas. Esta degradação promove anafase, ou seja, migração dos cromátídeos para os polos dos fusos mitóticos [5]. Ativação do APC-Cdc20 é inibida por *checkpoint* de montagem do fuso mitótico (SAC) até os microtúbulos ligam-se aos cinetocoros dos dois lados apostos (fig. 1.2).

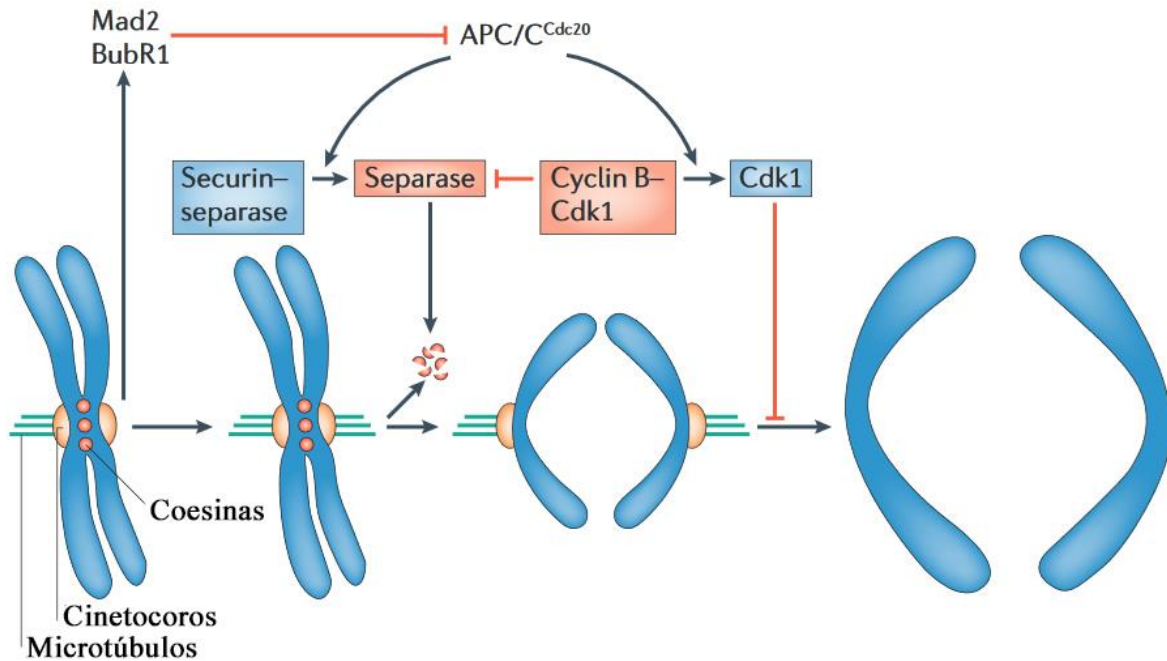


Figura 1.2. Regulação da anáfase e saída da mitose por APC-Cdc20. Durante a prometafase as proteínas de *checkpoint* de montagem do fuso mitótico (SAC) Mad2 e BubR1 são ativados nos cinetocoros que não são ligados aos microtúbulos. Os Mad2 e BubR1 ativados impedem a capacidade de APC-Cdc20 ubiquitinar as securinas e ciclina B, assim inibindo anáfase e saída de mitose. Durante a metafase quando todos os cinetocoros são ligados aos microtúbulos APC-Cdc20 ubiquitina securina e ciclina B, deste modo ativando a protéase securina e inativando o CDK1. Separase degrada a coesinas (círculos vermelhos) que mantem os cromátides ligados e inicia a segregação dos cromátides. A inativação do CDK1 permite a saída da mitose. Adaptado [4].

1.1.4.3. Regulação por CPC (*Chromosomal Passenger Complex*)

Um dos reguladores importantes do ciclo celular é o CPC (*Chromosomal Passenger Complex*). Este complexo é formado por quatro proteínas: Aurora B, INCENP, Borealin e Survivin. O CPC atua nos diferentes locais e nas diferentes estadias do ciclo celular e é responsável por: correção dos erros da ligação entre microtúbulos e centrossomas, ativação do *checkpoint* de montagem do fuso mitótico (SAC) (ver a frente), construção e regulação do aparelho de contração que conduz a citocinese.

Das quatro proteínas que constituem o CPC só Aurora B tem a função cinática. Para ser ativada, a Aurora B tem de ligar a INCENP e após essa ligação tem de ser autofosforilada [6]. Atividade de Aurora B depende da sua localização que é determinada por INCENP, Survivin e Borealin que ligam-se aos substratos diferentes durante o ciclo celular. Durante primeiros estádios de mitose o CPC localiza-se no centrómero interior por ligação do Survivin e Borealin

as histonas H3 e H2A [7],[8] onde Aurora B regula a SAC. Aurora B liga-se aos microtúbulos (MT) em crescimento por EB1 (*End-Binding Protein 1*) que está associada ao polo positivo dos microtúbulos. Além disso, o INCENP também liga-se diretamente aos microtúbulos por domínio SAH (*single α -helix*). Estas ligações aos microtúbulos são necessárias para localização do CPC no centrômero interior.

1.1.4.4. Regulação por *checkpoints* (Pontos de controlo)

Os *checkpoints* são mecanismos que controlam a ordem, a integridade e fidelidade dos maiores eventos do ciclo celular. Isto inclui o crescimento celular até o tamanho apropriado, a replicação e integridade dos cromossomas, e a sua segregação precisa na mitose. Muitos destes mecanismos são muito conservados entre reinos dos seres vivos. Hoje em dia são descritos três *checkpoints*: a) *checkpoint* de G1, também conhecido *por checkpoint* de restrição ou iniciação; b) *checkpoint* de G2/M; c) *checkpoint* de metafase ou verificação do fuso mitótico.

Os checkpoints no G1 e/ou no G2/M servem para controlar o tamanho celular. As células filhas de tamanho pequeno demoram mais tempo a passar para próxima fase do ciclo celular em comparação com as células filhas maiores [9],[10]. As células pequenas avançam no ciclo celular depois de atingir tamanho certo. Molecularmente o tamanho celular corresponde a nível/quantidade das proteínas envolvidas na progressão das fases G1 e G2/M.

Outro mecanismo que controla o ciclo celular está ligado aos danos relacionados com DNA. O ciclo celular para quando a célula deteta os danos do DNA para reparação. No caso em que a reparação do DNA é impossível ou demora demasiado tempo, a célula pode entrar em apoptose. Existem vários mecanismos que são ativados para reparar diferentes tipos de danos relacionados com DNA, mas o comum objetivo deles é manter os CDKs inativos até a reparação acabar. Diferentes tipos de danos no DNA ativam mecanismos diferentes, mas o objetivo comum deles todos é ativar a via de *Checkpoint Kinase 1* (Chk1). A via Chk1 é conservada desde leveduras até humanos e é mais eficaz nas fases S e G2 do que em G1 [11]. Quando o Chk1 está ativada ela inativa CDK1 e deste modo para a progressão do ciclo celular.

Nos organismos complexos o outro *checkpoint* relacionado com danos do DNA é o fator de transcrição p53. Quando o p53 está ativado ele começa a expressão dos vários genes, incluindo inibidores dos CDKs (CKI). Desta forma os CDKs do G1 são inibidos e o DNA fica reparado antes de ocorrer replicação. O p53 durante todo o ciclo celular consegue controlar a expressão dos genes [12],[13] e direciona o destino celular alternativo da apoptose ou da senescência [14].

Durante a fase S, os danos no DNA ativam os mecanismos mencionados anteriormente. A replicação do DNA começa nos locais definidos – origens de replicação. Este processo é epigeneticamente controlado por uma série de proteínas que iniciam a replicação. Uma vez ativadas, estas proteínas têm de ser degradadas quando a replicação acabar e para não haver outro ciclo de replicação. Os possíveis danos do DNA durante a replicação cria uma barreira física que impede a replicação. Nesta situação a maquinaria da replicação tem de ser estabilizada para não soltar do DNA onde não acabou a replicação até a barreira desaparecer. Quando a replicação para, a proteína que faz parte da maquinaria Mrc1 (*Mediator of the replication checkpoint*) fica ativada e recruta a Chk2. O Chk2 ligado a Mrc1 fica ativado por fosforilação e desta maneira estabiliza a maquinaria até o DNA ficar reparado.

Depois de ocorrer a condensação e migração dos cromossomas para o fuso mitótico é importante que os cinetocoros ficam ligados aos microtúbulos para haver a separação dos cromátídeos irmãos. As vezes os microtúbulos ligam-se incorretamente aos cinetocoros e as nossas células têm mecanismos de reparação para estas situações, mas isto demora algum tempo. Este tempo necessário para reparar as ligações incorretas é dado por *checkpoint* de montagem do fuso mitótico (SAC) que previne a entrada em anafase até a correta ligação entre microtúbulos e cinetocoros. O SAC foi identificado em leveduras e os principais componentes são proteínas da família Mad1, Mad2 (*Mitotic-Arrest Deficient*) e proteínas Bub1, Bub3 e BubR1 (*Budding Uninhibited by Benzimidazol*). O final complexo inibidor consiste em Mad2 e BubR1-Bub3 ligados a Cdc20 que é ativador do APC (*Anaphase Promoting Complex*) [15]. Este complexo é chamado *mitotic checkpoint complex* (MCC) e consegue ligar-se ao APC inibindo atividade de ligação de ubiquitina E3. Desta forma, o MCC inibe a degradação da securina e ciclina B. Além disso, as cinases Aurora B e Mps1 (*Monopolar spindle like protein 1*) são essenciais para a correta funcionalidade do SAC. Aurora B que faz parte do CPC (*Chromosomal Passenger Complex*) e está concentrado do centrómero. A ação cinática de Aurora B é necessária para recrutar o Mps1 para cinetocoro onde ocorre ativação do Mps1 por autofosforilação. O Mps1 ativado nos cinetocoros recruta complexo Bub1-Bub3 que, por sua vez, é necessário para recrutamento do Mad1-Mad2 que inibem o complexo APC-Cdc20. Quando ocorre a correta ligação dos microtúbulos aos cinetocoros a ação do Aurora B é inibida e o complexo MCC é removido [16]. Assim o APC-Cdc20 já consegue marcar as securinas e ciclina B para degradação, e libertar a separase que degrada as coesinas. Desta maneira o APC-Cdc20 promove anafase.

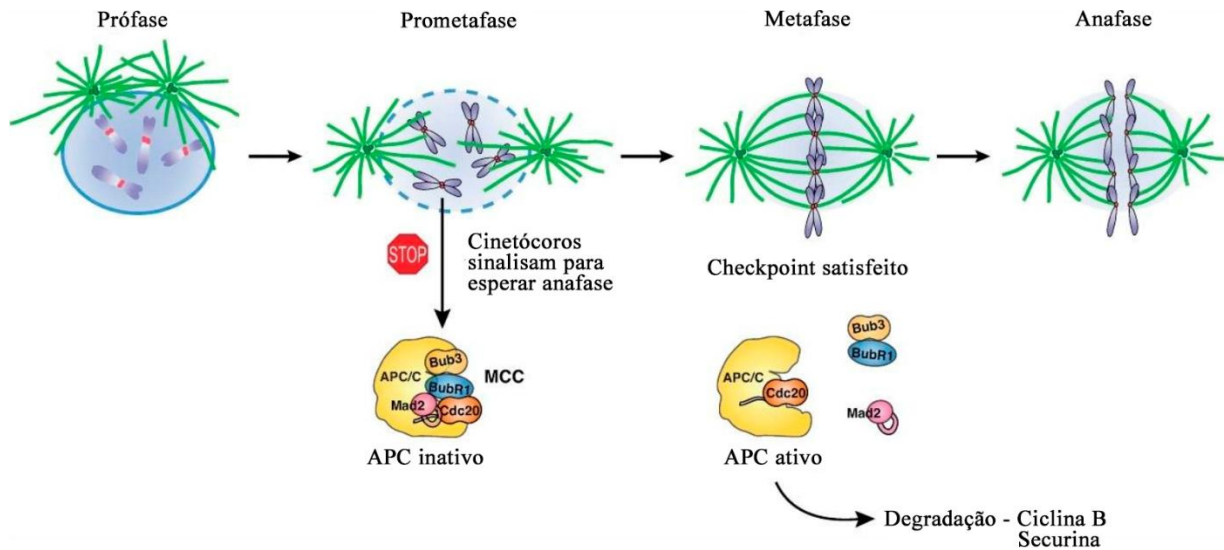


Figura 1.3. Regulação de segregação dos cromossomos por SAC. Durante a quebra da membrana nuclear o SAC fica ativado devido aos cinetocoros não ligados aos microtúbulos. O SAC ativado recruta o complexo MCC que liga-se e inibe o APC-Cdc20. Durante a metafase quando todos os cinetocoros ligam-se aos microtúbulos o SAC fica desativado libertando o APC-Cdc20 que marca a securina e ciclina B para degradação. Esta degradação resulta na separação dos cromatídeos e saída da mitose. Adaptado [16].

1.2. Mitotic Exit Network (MEN)

A MEN é a via de sinalização que promove a saída da mitose, facilita orientação do fuso mitótico e inicia a citocinese em levedura de brotamento *Saccharomyces cerevisiae*. A via MEN é estreitamente relacionada com a SIN (*Septation Initiation Network*) em levedura de fissão e com a via Hippo em mamíferos. Os componentes importantes da via MEN são Cdc15 e Dbf2-Mob1 que são ativados no início e no meio da anáfase para promover a função de Cdc14. A Cdc14 é uma fosfatase que determina a saída da mitose em *S. cerevisiae* neutralizando a atividade de CDK1. Em *S. cerevisiae* a Cdc14 é essencial para saída de mitose e os mutantes deste gene ficam presos na telofase [17].

Durante a maior parte do ciclo celular o Cdc14 está localizado e sequestrado dentro do núcleo onde fica ligado a inibidor Net1. O Net1-Cdc14 junto com o Sir2 formam complexo RENT (*REgulator of Nucleolar silencing and Telophase*). Pensou-se que o Cdc14 estava inativado quando fazia parte do RENT, mas nos estudos mais recentes foi demonstrado que o Cdc14 tem a função como a fosfatase na repressão de RNA polimerase II e esta função está conservada em humanos [18],[19],[20]. Entretanto, o essencial passo para a saída de mitose é

a dissociação de Cdc14 do RENT. Durante anafase a separase junto com Zds1 regula negativamente fosfatase PP2A-Cdc55 (tem função aposta da CDK1) que permite a fosforilação do Net1 por CDK1 [21]. A forma fosforilada do Net1 tem afinidade baixa para Cdc14 que permite a dissociação de Cdc14 do complexo RENT. Desta forma o Cdc14 fica libertado [22]. Esta primeira libertação do Cdc14 além de ser regulada por fatores mencionadas anteriormente também é regulada por Slk19, Spo12, Bns1, Fob1 e Cdc5. Todas estas proteínas fazem parte da via FEAR (Early Anaphase Release) [23]. O Cdc14 libertado por via FEAR tem várias funções no início da anafase, como a regulação da estabilidade do fuso e as forças dos microtúbulos, controla a correta segregação do rDNA e mais importante estimula a via MEN que leva a maior ativação do Cdc14 mais tarde durante anafase [24],[25],[26].

O principal interruptor da via MEN é a GTPase Tem1. A Tem1 é controlada por Bfa1-Bub2 que é uma GAP (*GTPase-Activating Protein*) e mantém a Tem1 inativa até fuso mitótico ficar corretamente alinhado. A localização do Tem1 junto com o Bfa1-Bub2 é assimétrica [27] e localizam-se no corpo do fuso polar (SPB, *Spindle Polar Body*) mais velho. Durante a divisão células em *S. cerevisiae* a célula filha acumula o Lte1 e a célula mãe acumula Kin4. Uma vez que Kin4 entra na célula filha, o Lte1 antagoniza a função do Kin4 [28]. Quando o SPB junto com o Tem1-Bfa1-Bub2 está localizado na célula mãe, o Kin4 fosforila o Bfa1. A fosforilação do Bfa1 por Kin4 impede a fosforilação do Bfa1 por Cdc5 (fig. 1.4. – B) [29]. A fosforilação do Bfa1 por Cdc5 liberta o Tem1 [29]. Assim, quando o SPB mais velho está localizado na célula mãe, o Tem1 e via MEN estão inibidos. Quando o SPB entra na célula filha, o Lte1 promove atividade do Cdc5, que por sua vez fosforila Bfa1 e liberta Tem1 (fig. 1.4. – A) [30]. O Tem1 ligado a GTP (*Guanosine TriPhosphate*) fica ativado e promove atividade do Cdc15. Após ativação o Cdc15 fosforila o Nud1, o componente da placa externa do SPB, e esta fosforilação recruta o Dbf2-Mob1.

O complexo Dbf2-Mob1 fosforila o Net1 e liberta Cdc14. Além disso, o Dbf2-Mob1 fosforila o Cdc14 nos locais que são responsáveis pela localização nuclear [31]. A fosforilação do Cdc14 por Dbf2-Mob1 impede o retorno do Cdc14 para o núcleo. O Cdc14 no citoplasma defosforila Cdh1 e Swi5. As formas fosforiladas do Cdh1 e Swi5 ficam retidos no citoplasma, e as formas defosforiladas migram para o núcleo onde ativam o APC e promovem a expressão do Sic1 [32],[33]. Ativação do APC-Cdh1 e acumulação do Sic1 diminuem atividade do CDK1 promovendo, desta maneira, a saída da mitose.

A fosforilação do Net1 por Dbf2-Mob1 é diretamente inibida por CDK1. O CDK1 fosforila e inativa diretamente o Dbf2-Mob1. O Dbf2-Mob1 fosforilado não consegue entrar no núcleo para fosforilar o Net1 [34].

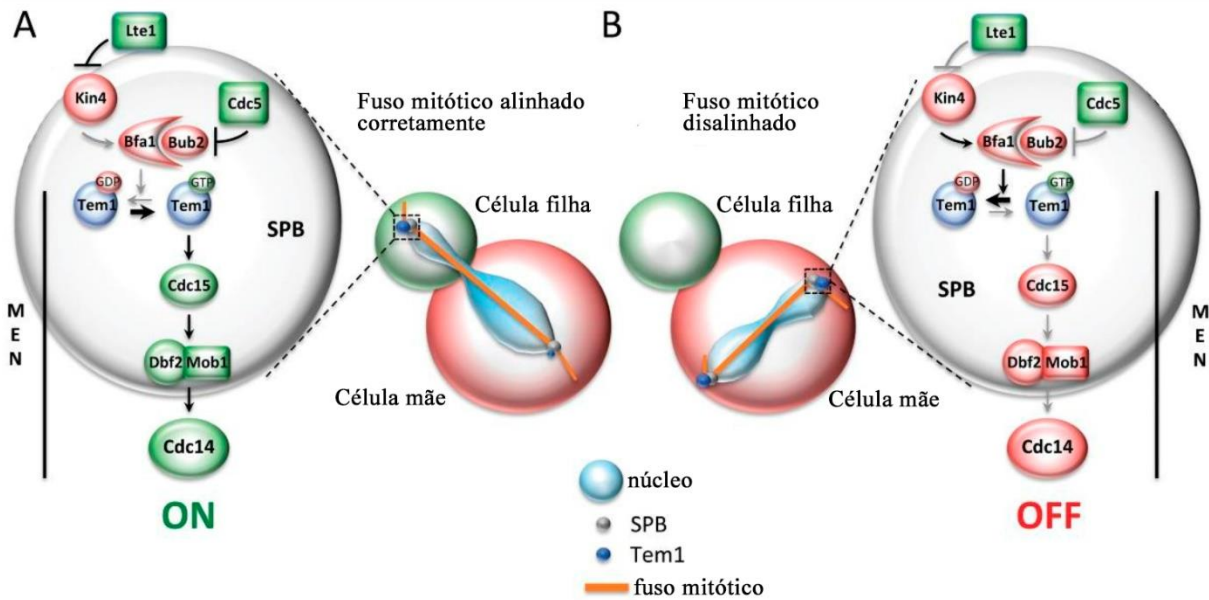


Figura 1.4. Desalinhamento do fuso provoca a quebra na assimetria do Tem1 no corpo do fuso polar (SPB). **A** – Quando as células alinham corretamente o fuso mitótico do eixo da célula mãe até célula filha, o Tem1 localiza-se preferencialmente no SPB que esta localizado dentro da célula filha. A localização do Tem1 dentro da célula filha desencadeia MEN por cascata de cinases (Cdc15, Dbf2-Mob1) que ativa a fosfatase Cdc14 e provoca a saída de mitose. O Lte1 e Kin4 são responsáveis por ativação ou inibição da MEN na célula filha e célula mãe, respectivamente, e são representados em verde e vermelho. **B** – Depois de desalinhamento do fuso a localização do Tem1 fica simétrica nos dois SPB que leva a inibição do Tem1 por complexo GAP Bub2-Bfa1, ou seja, inibe a saída da mitose. A GAP fica ativa por cinase Kin4, que que neutraliza a fosforilação inibidora do GAP por Cdc5 Adaptado [118].

Os componentes da via MEN além de serem necessários para a saída da mitose, também são importantes para a citocinese. Foi demonstrado que os mutantes de MEN em *S. cerevisiae* não foram capazes de acabar a citocinese [35],[36] durante vários ciclos celulares resultando numa cadeia de células com núcleo segregado corretamente, mas com os anéis de actomiosina descontraídos. O Cdc15, Cdc5, Cdc14, Dbf2 e Mob1 localizam-se no anel de contração durante a citocinese [35],[37],[38]. O Tem1 é necessário para a contração do anel de actomiosina e separação dos anéis de septina [39]. A melhor ligação entre a via MEN e citocinese é feita por

Dbf2-Mob1 que controlam a proteína Hof1 (*Homolog Of cdc Fifteen*). Nas estadias G1/S o Hof1 localiza-se no anel da septina até anafase tardia, e migra para o anel de actomiosina onde promove a contração do anel e formação do septo primário em complexo com Cyk3 e Inn1 [40]. Durante a citocinese o Dbf2-Mob1 fosforila o Hof1 diminuindo interação com as septinas, assim facilitando a interação com anel de actomiosina, e promove a função na contração do anel de actomiosina [41]. Foi demonstrado que o Cdc5 controla o posicionamento e a atividade de Rho1 (RhoA em humanos) que é o regulador da montagem e contração do anel de actomiosina [42] e esta função é conservada em humanos [43]. O Cdc5 regula o Hof1 durante a citocinese por pré-fosforilação gerando um local de ligação para Mob1 [44].

1.3. A via Hippo

A via Hippo é conservada entre moscas e mamíferos. A via Hippo é responsável pela regulação do tamanho dos órgãos e possivelmente é responsável pela saída da mitose e regulação da citocinese.

A via Hippo é nomeada assim por causa de Hippo cinase que foi descoberta em *Drosophila*. Nas moscas esta via é composta por Warts, Salvador, Happy, Mats, Yorkie (Yki) e Scalloped (Sd) enquanto nos mamíferos a via Hippo é mais complexa (fig. 1.5) e é uma das mais estudadas, porque a desregulação desta via leva ao aparecimento dos tumores.

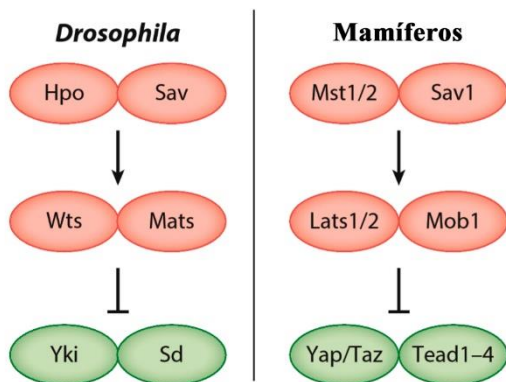


Figura 1.5. A comparação dos componentes da via Hippo entre mamíferos e *Drosophila*.

A inativação genética na maior parte dos componentes da via Hippo com exceção do Yki e Sd, leva ao sobrecrescimento celular nos olhos, asas e/ou membros [45],[46],[47],[48]. Por outro lado, a inativação do Yki reduz o crescimento dos tecidos [49].

A cascata de cinases feita por componentes da via Hippo é responsável por inibição do Yki e Sd (fig. 1.5). Os ortólogos de Happy (Hpo) em mamíferos são Mst1/2 (*Mammalian Sterile 20-like 1 and 2*). As Mst1/2 liga-se a Sav1 (ortólogo do Salvador em mamíferos) e esta ligação é necessária para fosforilar e ativar os componentes da via como Sav1, MOB1A/B

(ortólogos do Mats em mamíferos) e Lats1/2 (*Large Tumor Suppressor 1 and 2*, ortólogos do Warts em mamíferos) [50],[51],[52]. As Lats1/2 fosforilados por Mst1/2 interagem com Mob1A/B fosforilados, e esta interação permite a ativação dos Lats1/2 [51],[52]. Foi demonstrado que o Nf2 (*Neurofibromatosis 2*, ortólogo do Merlin em mamíferos) é responsável pelo recrutamento de Mst1/2 e Lats1/2 para membrana plasmática onde ocorre a fosforilação e a ativação das Lats1/2 por Mst1/2 [53] (fig. 1.6). As Lats1/2 diretamente fosforilam Yap (ortólogo de Yki em mamíferos) e Taz [54],[55]. Os Yap e Taz são co-ativadores de transcrição que são inativados e sequestrados no citoplasma quando são fosforilados pelas Lats1/2. As formas não fosforilados do Yap e Taz são acumulados dentro do núcleo e interagem com a família de fatores de transcrição TEAD1-4 (ortólogos do Sd em mamíferos) que induzem a expressão dos genes responsáveis por proliferação, diferenciação e morte celular, desta forma regulando a homeostase dos tecidos e tamanho dos órgãos [56],[57],[58] (fig. 1.6). As Lats1/2 também interagem com as proteínas da família Amot (*Angiomotin*) [59]. A fosforilação do Amot por Lats1/2 aumenta a estabilidade e diminui a afinidade de ligação do Amot aos filamentos da actina (fig. 1.6). A regulação do Amot por via Hippo é crítica por diferenciação dos blastocistos, angiogênese e migração celular [59],[60]. Além disso, Amot consegue interagir diretamente com Yap e localizar-lo na junção apertada ou no citoesqueleto da actina. Portanto, Amot consegue limitar ação do Yap pelos mecanismos dependentes e independentes do Lats1/2 [61],[62]. Entretanto a interação do Amot e via Hippo não é conservada evolutivamente, porque não foi identificado nenhum ortólogo do Amot em *Drosophila*.

Nas junções aderentes, α -catenina forma complexo com 14-3-3 e Yap fosforilado e desta maneira inativa o Yap [63]. Atividade do Yap é sensível a rigidez da matriz extracelular, e pensa-se que Yap é um sensor de mecanotransdução [64]. Tensão celular, geometria celular, distribuição celular e fixação/separação celular também regulam a via Hippo [65],[66]. Em todos os casos as alterações na atividade de Yap e Taz são associados a atividade de Rho GTPase e rearranjo do citoesqueleto da actina (fig. 1.6). Provavelmente, a atividade cinática das Lats1/2 é regulada por densidade celular, geometria celular, ligação celular e ligantes do GPCR (*G protein-coupled receptors*) numa maneira dependente de Rho [65],[66],[67],[68]. Os ligantes do GPCR regulam positivamente ou negativamente os Yap e Taz dependendo da classe das proteínas G ativadas (fig. 1.6). Os ligantes dos $G\alpha_{12/13}$ -, $G\alpha_{q/11}$ -, e $G\alpha_{i/o}$ - promovem atividade dos Yap e Taz [68], enquanto os ligantes do $G\alpha_s$ - inibem suprimem atividade [69]. Além de sinalização do GPCR, o EGF (*epidermal growth factor*) pode regular a via Hippo [70] por recetor de EGF (EGFR).

A polaridade celular também regula a via Hippo. Os Merlin (Mer), Expanded (Ex), e Kibra que nas células são localizados apicalmente, formam o complexo e ativam o Wts (Lats1/2 em mamíferos) [71],[72]. A função deste complexo apical foi conservada em mamíferos. Os

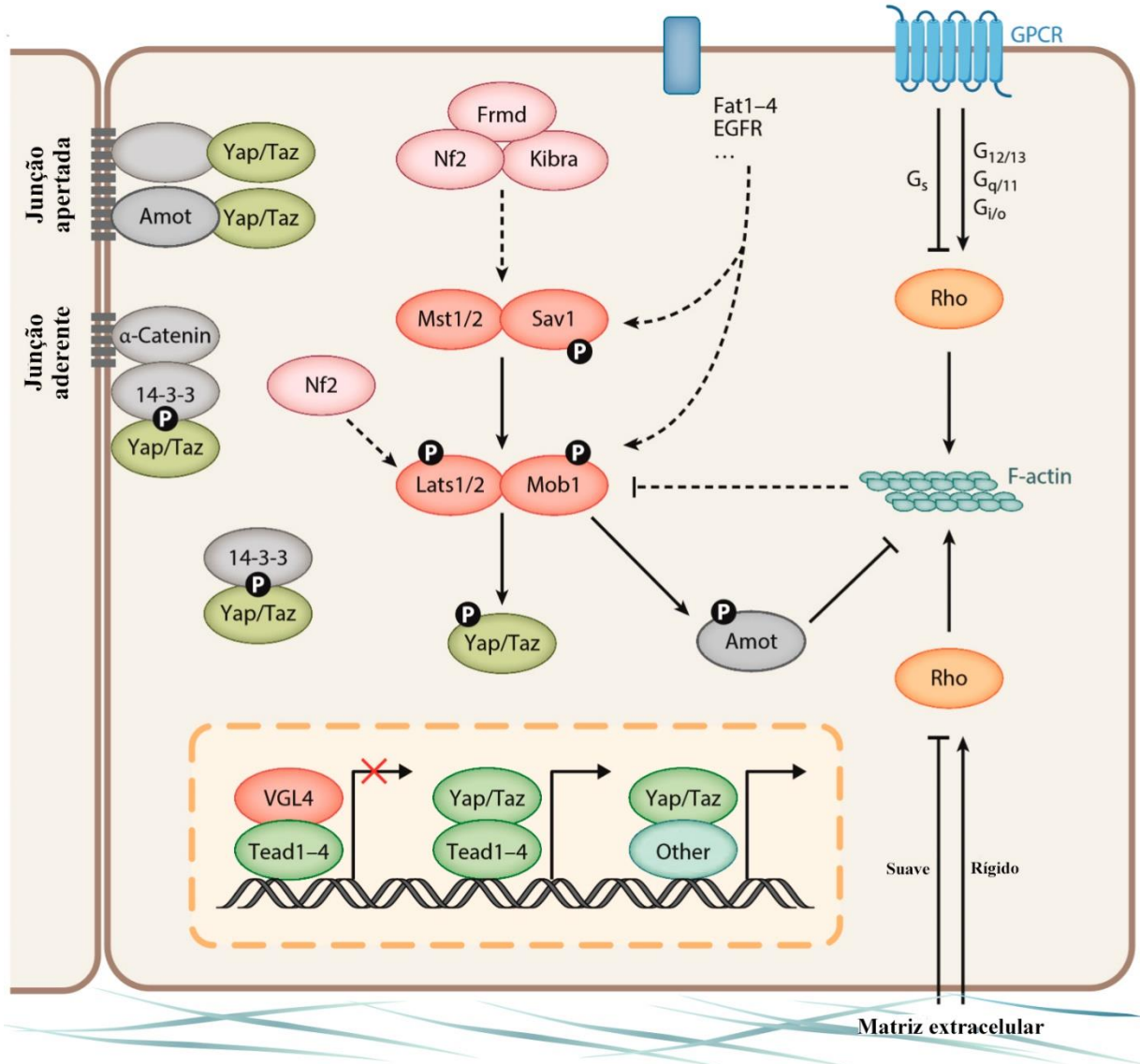


Figura 1.6. Regulação da via Hippo. O TEAD1-4 interage com VGL4 que é um repressor da transcrição. Quando Yap e Taz estão localizados dentro do núcleo, eles interagem com TEAD1-4 e outros fatores de transcrição para promover expressão de genes. Os Yap e Taz competem com VGL4 pela ligação à TEAD1-4. A regulação do Yap e Taz é feita principalmente pela fosforilação por componentes da via Hippo, tais como Mst1/2 e Lats1/2. Após fosforilação os Yap e Taz ligam-se com 14-3-3 e ficam sequestrados no citoplasma. Os Yap e Taz localizam-se na junção celular após a interação com os componentes da junção celular tais como Amot e α-catenina. As cinases da via Hippo são regulados pela polaridade celular, sinalização GPCR e estímulos mecânicos. As alterações no citoesqueleto de actina (por Rho GTPase) é a possível chave na regulação das Lats1/2. Além disso, Amot interage com Lats1/2 e pode regular o citoesqueleto da actina. Adaptado [119].

Nf2 (ortólogo do Mer), Kibra, and Willin (ortólogo potencial do Ex) reprimem atividade do Yap [71],[73].

1.3.1. Semelhança entre via Hippo e via MEN

Se a sinalização mitótica de Hippo funcionasse de forma semelhante à via MEN de levedura, as cinases regulados por MOB1A/B tais como Mst1/2-Lats1/2-Ndr1/2 (*Nuclear Dbf2-Related Kinase 1 and 2*), que fazem parte da via Hippo e contribuem para progressão do ciclo celular e biologia centrossomal [74],[75] deviam regular as fosfatases CDC14 em mamíferos (Cdc14 em *S. cerevisiae*), mas não é o caso. O CDC14 está ligado com a via Hippo pela regulação da Kibra [76], que funciona acima de Hippo. Portanto, o CDC14 funciona de maneira diferente nas células dos mamíferos do que Cdc14 em levedura[77]. Os principais efetores da via Hippo são Yap e Taz, que são fosforilados e inibidos por Lats1/2 e Ndr1/2. Foi demonstrado que o Yap e Taz promovem expressão de genes que são envolvidos no controlo da entrada na fase S do ciclo celular e mitose [78]. A fosforilação do Yap e Taz por CDK1 é necessária para progressão normal da mitose. A expressão dos mutantes da Yap (*phospho-mimetic mutant*) provocam defeitos no fuso mitótico e má segregação dos cromossomas [79], enquanto a expressão dos mutantes do Taz (*phospho-acceptor mutant*) provoca defeitos no fuso mitótico e má segregação/alinhamento dos cromossomas [80].

O MOB1A/B consegue interagir com Mst1/2, Lats1/2 e Ndr1/2 que são ligados a regulação da mitose, mas por enquanto não se sabe pela qual cinase o MOB1A/B tem a função na mitose. É possível que MOB1A/B interaja por domínio conservado de fosfo-serina/treonina que contribui para a sinalização mitótica da via Hippo, como foi descrito do Mob1 na via MEN em leveduras [81].

Além disso, foi demonstrado que os MOB1A/B têm uma localização específica durante mitose e são necessários para a execução de citocinese [82].

Um membro comum às duas cascatas de sinalização MEN e Hippo é a proteína Cdc5 que regula a cascata de cinases em levedura e PLK1 (*Polo-Like Kinase 1*) em mamíferos. Na mitose os componentes da via Hippo Lats1/2 funcionam acima de PLK1, enquanto as NDR1/2 funcionam abaixo de PLK1. As Lats1/2 conseguem indiretamente inibir a função PLK1 por defosforilação [83]. Além disso, a fosforilação do APC pelas Lats1/2 afeta a ubiquitinação do PLK1 [84]. Portanto as Lats1/2 podem funcionar acima do PLK1 por diferentes mecanismos. A Ndr1 regulada por MOB1A/B controla a orientação do fuso mitótico [85]. A fosforilação da

Ndr1 por PLK1 interfere com a ligação do Ndr1 com MOB1A/B, deste modo inibe/restringe atividade da Ndr1.

Em suma, os componentes da via Hippo Mst1/2, Lats1/2, Ndr1/2, MOB1A/B, Yap e Taz têm funções na regulação dos diferentes eventos mitóticos. É sugerido que estes componentes nem sempre são interligados numa cascata de sinalização, e podem funcionar como unidades separadas fora da via Hippo. A via MEN e via Hippo mostram algumas similaridades na regulação dos eventos mitóticos e citocinéticos. Como já foi mencionado anteriormente o Cdc14 é o efetor final da via MEN, mas as fosfatases CDC14 em humanos não parecem ser o efetor final da via Hippo. Entretanto ainda temos de perceber como a via Hippo é interligada com a mitose. É possível que o MOB1A/B seja chave para perceber a regulação da mitose por via Hippo.

1.4. A família dos MOBs

A quantidade das proteínas dos MOBs aumenta com a complexidade do organismo. Por exemplo, em *S. cerevisiae* há duas MOBs: Mob1 e Mob2. Enquanto, em humanos há sete MOBs: MOB1A, MOB1B, MOB2, MOB3A, MOB3B, MOB3C, MOB4 (phocein). Os MOBs apresentam grande homologia ao nível proteico (tab. 1 e 2).

Tabela 1. Comparação de homologia proteica entre MOB1A com família dos MOBs em humanos.

Gene	MOB1B	MOB2	MOB3A	MOB3B	MOB3C	MOB4
Homologia	95%	37%	50%	50%	49%	25%

Tabela 2. Comparação de homologia proteica entre MOB1A humano e família dos MOBs entre outras espécies.

Gene	<i>S. cerevisiae</i>		<i>Drosophila melanogaster</i>			
	scMob1	scMob2	dMob1	dMob2	dMob3	dMob4
Homologia	48%	35%	86%	34%	51%	24%

O Mob1 é um gene evolutivamente conservado com homólogos em todos os reinos principais, desde protistas até humanos. O gene na primeira vez foi identificado como uma proteína de ligação a Mps 1 nas leveduras e desta interação vem o nome – *Mps One Binder* (MOB). Os dados iniciais sugeriram que Mob1 é essencial para a sobrevivência das células e

desempenha um papel importante na saída da mitose e citocinese em *S. cerevisiae* (ver atrás)[86].

Em *Drosophila* o MOB1 (dMob1 ou Mats) é necessário para controlo da proliferação celular e apoptose. A perda de Mats é letal nas moscas [87]. O Mats é necessário para adequada segregação cromossômica nos embriões [87]. No entanto, nos mutantes nulos de Mats os *checkpoints* não são afetados, e ainda não se sabe porque a perda de dMob1 pode levar a mitoses aberrantes. Além disso, nos mutantes nulos do Mats em *Drosophila* o MOB1A humano consegue recuperar o fenótipo, ou seja, a função do Mats foi conservada em mamíferos [46].

O MOB1 nas células humanas é expresso sob duas formas - hMOB1A e hMOB1B que são principalmente proteínas citoplasmáticas. As MOB1A e MOB1B ao nível da proteína são 95% idênticos e podem hiperativar as cinases NDR/LATS quando direcionadas para a membrana plasmática de células humanas [88],[89]. Foi demonstrado que o MOB1A é localizado nas centrossomas e nos cinetocoros durante prometáfase, e participa na duplicação das centrossomas [90]. Nos estudos recentes foi demonstrado que na redução das proteínas MOB1A e MOB1B as centrossomas falham a reunir após abscisão, e por outro lado, sobre-expressão de um ou de outro diminui o número de células com centrossomas separadas [82]. A desativação de MOB1A ou MOB1B é suficiente para promover o desenvolvimento cancerígeno nos ratinhos. Os modelos nulos de MOB1A/B nos ratinho não são viáveis e morrem nas primeiras fases do desenvolvimento, tal e qual como nas moscas, porém a deleção condicional nos ratos adultos causa cancro [91],[92]. Mesmo que o organismo morre, as células do feto continuam vivas. Os fenótipos da deleção do MOB1A/B são semelhantes aos da deleção dos seus parceiros de ligação Ndr1 e Lats1/2 [93].

O Mob2 foi descoberto nas *S. cerevisiae* e foi mostrado que o Mob2 não é essencial nas leveduras [86]. Em *S. cerevisiae* o Mob2 é importante para assimetria das células, as células mães e células filhas têm destinos distintos, e Cbk1 cinase (segunda cinase Ndr/Lats em *S. cerevisiae*) e sua proteína de interação Mob2 regulam esta assimetria e o crescimento polarizado. Na *Drosophila* o dMob2 tem uma função que participa no desenvolvimento dos pelos das asas. Além disso, o dMob2p pode formar um complexo com Trc, e a sobre-expressão do dMob2 truncado tem o mesmo fenótipo que mutantes do Trc [94]. Nos mamíferos o MOB2 liga-se com os Ndr1/2 cinases, mas não com as Lats1/2, e alguma fração do MOB2 é detetada no núcleo das células. O MOB2 liga-se ao mesmo domínio do Ndr1/2 que o MOB1, e esta ligação tem efeito oposto do Mob1. Mais precisamente, experiências bioquímicas mostraram

que MOB2 compete com MOB1 na ligação com o NDR, o complexo MOB1/Ndr correspondente a aumento da atividade da cinase Ndr e o complexo MOB2/Ndr associado com a diminuição da atividade cinática do Ndr [95]. Ainda não se sabe a função biológica do complexo MOB2/Ndr, nem a função fisiológica do MOB2. Recentemente foi demonstrado que nas células humanas a deleção do MOB2 causa defeitos na proliferação celular, precisamente no bloqueio do ciclo celular na fase G1/S [96]. Além disso, o MOB2 é necessário para a sobrevivência das células quando são expostos aos agentes que danificam o DNA.

Nos mamíferos MOB3 tem três formas: MOB3A, MOB3B e MOB3C. Os MOB3A/B/C são principalmente proteínas citoplasmáticas que não interagem com Lats1/2 nem com Ndr1/2. Foi sugerido que o hMOB3 regula a clivagem de Mst1, e essa regulação afeta a atividade apoptótica da cinase. A sobre-expressão de hMOB3 restringe a clivagem de Mst1 e protege contra a indução da apoptose. Por outro lado, a deleção do hMOB3 nas linhas celulares tumorais da glioblastoma, onde o hMOB3 é sobre-expresso, reduz a clivagem Mst1 e sensibiliza as células para a indução da apoptose. Dados até hoje demonstram que o hMOB3 pode ser um oncogene [97].

Até hoje não houve muitos estudos do MOB4. Sabe-se que nas *Drosophila* a deleção do MOB4 (dMOB4) é letal nas larvas [98]. Esta letalidade pode ser recuperada por introdução do MOB4 humano (hMOB4), indicando a conservação funcional e ortográfica entre espécies. O dMOB4 tem função única nos neurônios pós-mitóticos na regulação e formação das sinapses, no transporte axonal e na organização dos microtúbulos no sistema nervoso [98],[99].

1.5. Estudo do gene ASPM

O gene ASPM (*Abnormal Spindle-like Microcephaly Associated*) foi descoberto em *Drosophila* (ASP, ortólogo do ASPM) onde as mutações causaram a formação anormal de fuso mitótico [100]. As centrossomas ficam separadas do corpo do fuso mitótico e os microtúbulos do fuso ficam desfocados na ausência do ASP [101]. O ASP é concentrado nos fusos polares e está ligado à extremidade negativa dos microtúbulos do fuso [102]. Em *Drosophila* a deleção do ASP causa microcefalia que é provocada por má segregação dos cromossomas que está associada com os polos mitóticos desfocados [103].

Em humanos, as mutações do ASPM e do *WD Repeat-Containing Protein 62* (WD62) são duas causas genéticas comuns que levam a metade dos casos da microcefalia. O ASPM e

WD62 se localizam no centríolo mãe e são necessários para recrutar o CENPJ/CPAP/SAS-4 a zona apical das células [104]. O CENPJ/CPAP/SAS-4 é responsável por alongação e divisão normal dos centríolos e centrossomas [105]. Além desta função os estudos mostram que as células mutantes nulas de SAS-4 não possuem centrossomas nem cílio primário [105]. Estas alterações ocorrem em todos os tecidos e não só nas células neuronais. A deleção parcial do ASPM causa má orientação do fuso mitótico, falha na citocinese, redução do índice mitótico e apoptose [106]. O reduzido tamanho do cérebro é o resultado da falha das mitoses neurogênicas, que consequencialmente levam a reduzido número de células no cérebro [104]. O modelo proposto é que as alterações genéticas no ASPM levam às alterações na orientação do fuso mitótico [106], e são estas alterações que são críticas no cérebro em desenvolvimento. Por outro lado, a deleção do ASP nas células de *Drosophila* em cultura é suficiente para causar os defeitos no fuso mitótico, enquanto a deleção do ASPM nas células humanas em cultura não causa defeitos mitóticos [107].

Para aprofundar os estudos do ASPM no nosso grupo foram criados alelos de *Drosophila* nulos para o gene ASP (ASPM em humanos). Além disso, decidiu-se fazer a deleção do ASPM nas células HeLa e RPE-I (células humanas) por CRISPR (ver a frente). Os resultados obtidos nas moscas e nas células humanas permitem uma base sólida para tirar as conclusões sobre as funções do ASP/ASPM. Os resultados obtidos *in vitro* na cultura de células podem diferir do organismo vivo. Por isto, é importante confirmar os resultados obtidos no organismo vivo, no nosso caso seriam as moscas.

1.6. Engenharia genética

A engenharia genômica nasceu na década 1970, tendo sido demonstrado que o DNA exógeno pode ser absorvido por leveduras ou bactérias e integra-se aleatoriamente no genoma. Os trabalhos subsequentes demonstraram que esse processo também pode ocorrer de forma direcionada. A microinjeção do DNA dentro do núcleo de uma célula estimula a recombinação homóloga da célula. Nos anos 80 foi introduzido a Cre-loxP (fig. 1.7) recombinação, que é uma técnica de recombinase específica localizada, usada para realizar deleções, inserções, translocações e inversões em locais específicos no DNA das células. O Cre-lox é uma tecnologia que pode ser usada para induzir eventos de recombinação específicos na zona do genoma escolhida. O sistema consiste em dois componentes derivados do bacteriófago P1: a recombinase Cre e um local de reconhecimento loxP. O bacteriófago P1 usa esses componentes

como parte do seu ciclo de vida natural e os investigadores adaptaram os componentes deste vírus para uso na manipulação do genoma. Os locais do loxP são longas sequências de reconhecimento de 34 pares de bases constituídos por duas longas repetições palindrómicas de 13 pb separadas por uma sequência central que é um espaçador assimétrico de 8 pb. A assimetria do espaçador dá a direccionalidade local do loxP.

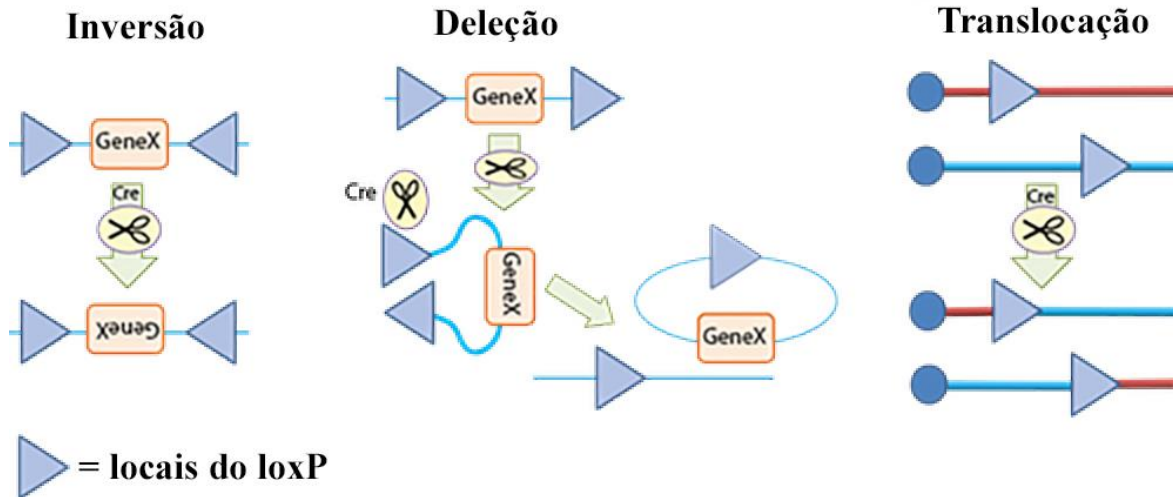


Figura 1.7. Possíveis manipulações de DNA com Cre-lox. **Inversão:** se os locais de loxP estão na mesma cadeia de DNA e estão em orientações opostas, a recombinação resulta numa inversão e a região do DNA entre os locais loxP é revertida. **Deleção:** se os locais de loxP são orientados no mesmo sentido, a sequência entre os locais loxP é excisada como um pedaço circular de DNA (e que não é mantida). **Translocação:** se os locais de loxP estão em moléculas de DNA separadas (cromossomas diferentes), um evento de translocação é gerado nos locais loxP.

Em geral, a edição precisa do DNA e requer a ação de uma máquina molecular composta por duas partes principais: um domínio de ligação ao DNA que reconhece o local específico na genoma e um domínio efector que permite a clivagem do DNA. A criação de uma corte de cadeia dupla (DBS – *double-strand break*) num local específico usando uma endonuclease pode estimular a via de reparação do DNA e pode aumentar consideravelmente a taxa de modificação do gene no local específico.

O componente principal da engenharia genómica é a recombinação homologa que naturalmente ocorre em baixa frequência, que por sua vez limita bastante a eficiência da edição. Para resolver esta limitação em 1985 Oliver Smithies *et. al.* usaram a função das endonucleases *in vitro* e *in vivo* para criar cortes de cadeia dupla do DNA. Quando são apontadas num locus estas enzima cortam o DNA, que por sua vez, força a célula reparar o corte de cadeia dupla por *Non-homologous end joining* (NHEJ) ou *homology-directed repair* (HDR) (fig. 1.8). O NHEJ

acontece com a maior frequência que HDR, mas tem maior erro associado a reparação do DNA. O NHEJ ocorre quando o modelo da reparação não é fornecido e os erros associados frequentemente levam às mutações inativas. No caso do HDR, o modelo de reparação usado leva as modificações genómicas desejadas permitindo uma edição muito precisa. Além de introduzir mutações pontuais ou os locais de recombinação, os modelos de reparação também podem ser usados para introduzir um gene de interesse em um determinado locus.

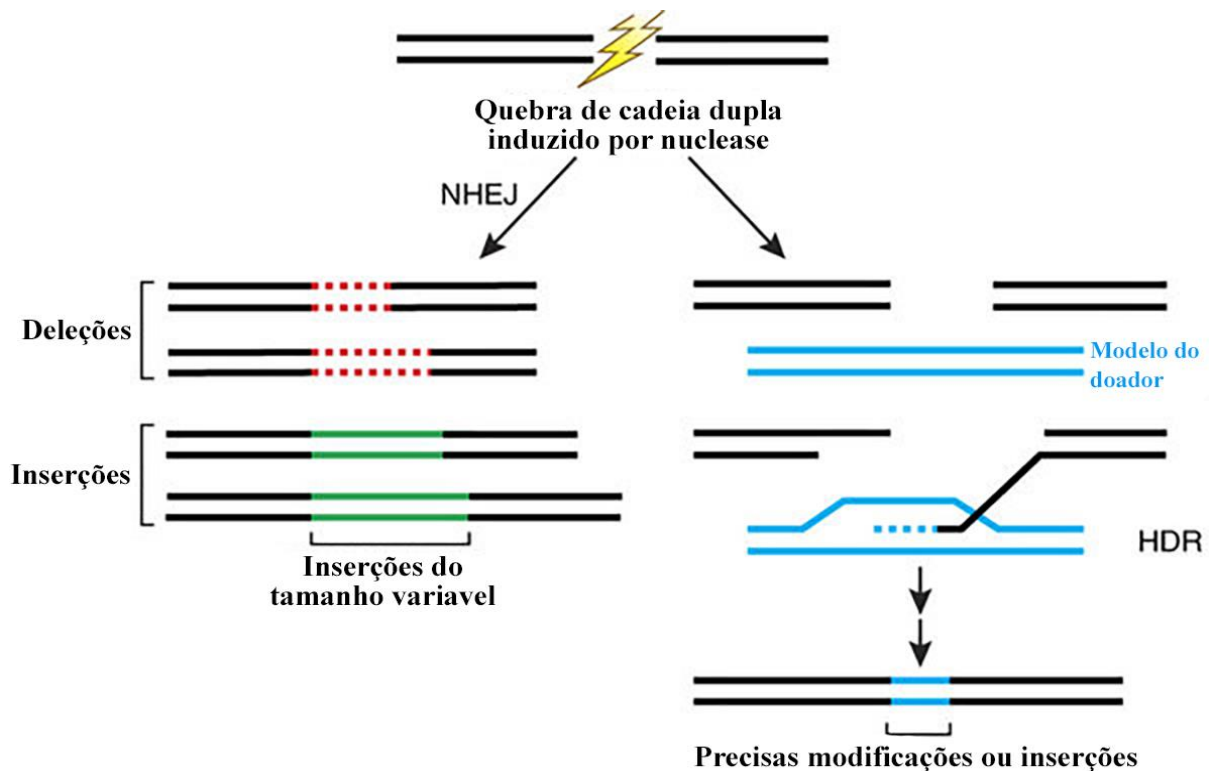


Figura 1.8. Esquema simplificado de tipos de reparação do DNA induzidos por quebras de cadeia dupla. Vermelho traçado – deleções do tamanho variável. Verde – inserções do tamanho variável. Azul – modelo do doador (*template*).

Os primeiros nucleases eficientes e direcionadas são os *Zinc Fingers Nucleases* (ZFN). Os ZFN são uma classe de proteínas desenhadas para ligar especialmente ao DNA e induzir os cortes de cadeia dupla. Os ZFN são compostos por duas unidades funcionais (fig. 1.9). A primeira unidade é responsável pela ligação ao DNA e é composto por dois domínios de ligação onde cada um reconhece 6 pb. Os dois módulos de ZFN são ligados para criar uma proteína específica de menor ou igual a 24 pb. A segunda unidade é responsável pelo corte de cadeia dupla e é composto de duas subunidades de nuclease FokI. Quando os dois domínios de ZFN são ligados é criado um par muito específico de tesoura genómica.



Figura 1.9. Representação do *Zinc Fingers Nucleases*. Um ZFN hibrida com 3 nucleótidos da sequência genômica. Para aumentar especificidade usam-se dois ZFN com parte de FokI em cada ZFN. A ação do nuclease é adquirida após de sobreposição de duas subunidades de FokI.

Um dos maiores problemas de uso dos ZFN é a sua complexidade na produção. Um cientista experiente demora à volta de seis semanas para sintetizar os ZFN de interesse. Por outro lado, os ZFN são muito específicos na ligação ao DNA, que diminui a probabilidade de ter efeitos de *offtarget*.

Depois dos ZFN, foram descobertas as *Transcription activator-like effector nucleases* (TALEN). Os TALEN substituíram rapidamente os ZFN por causa da sua síntese mais fácil. Os TALEN são compostos por duas unidades (fig. 1.10) tal como os ZFN. A primeira unidade *Transcription activator-like* (TAL) é responsável pela ligação ao DNA. O TAL é composto por repetições de 33-35 aminoácidos. Estas repetições diferem uma de outro por 2 aminoácidos localizados na 12^a e 13^a posição e estas variações definem o ácido nucleico a qual o TAL hibrida e chamam-se *repeat-variable di-residue* (RVD). E a segunda unidade FokI é responsável pelo

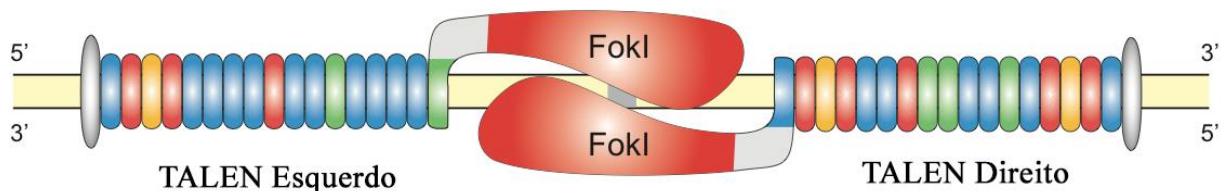


Figura 1.10. A *TAL effector nuclease* (TALEN). O princípio do funcionamento é parecido a ZFN. Os RVD que determinam o ácido nucleico a qual TAL se liga: HD liga a citosina, NI liga a adenina, NG liga a timina e NN liga a guanina e a adenina.

corte de cadeia dupla. Em comparação com os ZFN os TALEN são conhecidos pela fácil produção. A produção de plasmídeo do TALEN para transfecção demora três dias.

Quando se pensou que a engenharia genômica não conseguiu melhorar, veio a técnica *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9* (CRISPR/Cas9). O CRISPR é um componente importante do sistema imunitário bacteriano que permite que as bactérias se lembrem e destruam os fagos. Em aplicações de engenharia genômica, a endonuclease Cas9 é direcionada pela sequência de guia RNA (gRNA) para um determinado locus, onde induz um corte de cadeia dupla. Como os ZFNs e TALENs, o CRISPR/Cas9 emprega HDR, mas o uso de RNA para especificar edição torna o sistema mais barato e menos demorado, bem como mais preciso e escalável.

O sistema CRISPR/Cas9 usa uma endonuclease não específica Cas9 para cortar o genoma e um pequeno RNA (gRNA) para guiar esta nuclease para um local de corte definido por utilizador. Os sistemas nativos de CRISPR nas bactérias possuem uma variedade de enzimas responsáveis pelo processamento de DNA estranho, bem como os gRNA necessários para a função de endonuclease (fig. 1.11). Quando usado para edição genômica a única proteína CRISPR requerida é a endonuclease Cas9. O Cas9 possui todos os componentes necessários para ligar a gRNA, ligar a sequência do DNA alvo e fazer o corte de cadeia dupla. O único requisito de CRISPR para haver um corte de cadeia dupla é a presença de sequência *Protospacer Adjacent Motif* (PAM) no DNA imediatamente a jusante (3') do local do alvo de gRNA. Na ausência do gRNA ou de uma sequência PAM, Cas9 não irá ligar nem cortar a sequência alvo.

Quando o sistema CRISPR/Cas9 é usado, esta cria cortes de cadeia dupla nos locais do genoma que hibridam com gRNA. Como as células humanas são diploides, há uma grande probabilidade que as alterações desejadas ocorram só num dos alelos. Isto quer dizer, que depois de haver a reparação do DNA numa colônia de células pode haver três tipos de células. O primeiro tipo são células sem alterações no genoma, porque o sistema de reparação funcionou perfeitamente. O segundo tipo são as células que têm alterações só num dos alelos. E terceiro tipo são as células que têm alteração bi-alelica, ou seja, nos dois alelos.

Para melhorar a seleção usa-se o sistema CRISPR/Cas9 com o plasmídeo HDR que serve como um doador de sequência que as células podem usar para reparação precisa do genoma. Por outras palavras, quando ocorre o DSB as células podem usar a sequência doador em vez de alelo homólogo. Claro que as sequências HDR vão competir com a sequência do DNA homóloga, mas as células só têm duas cópias da região genômica, onde depois de

transfecção dentro da célula pode haver centenas de cópias de HDR. Para as células usarem o HDR como o modelo de reparação, estas têm de ter grande homologia. Para tal, adicionam-se os braços homólogos (*homology arms*) no mínimo de 100 bp nas extremidades 5' e 3' do HDR.

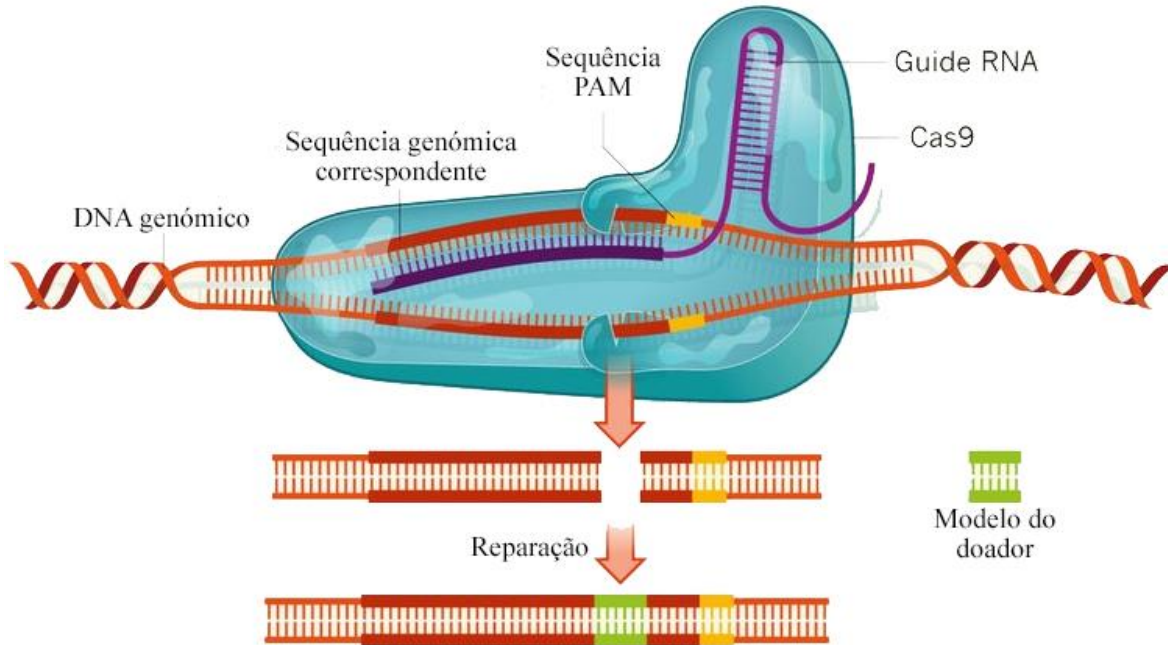


Figura 1.11. Sistema CRISPR/Cas9. O Cas9 consegue desenrolar e abrir o DNA para o gRNA hibridar com a sequência alvo. A sequência do PAM é 5'-NGG-3' e está localizada depois do local da hibridação do gRNA.

Além de criar mutações pontuais por inserção de HDR, também podemos inserir ou tirar as sequências do DNA do genoma. Para facilitar a seleção dos clones onde ocorreu a alteração desejada é muito comum inserir na sequência do HDR os genes que codificam para a resistência contra uma droga e/ou um marcador fluorescente. Quando ocorre alteração genómica desejada, a célula começa a expressar os genes da resistência e fluorescência. Assim, pode-se incubar as células com uma droga que causa a morte das células sem gene de resistência, ou selecionar as células que têm sinal fluorescente. Estes métodos excluem as células onde não ocorreram nenhuma alteração genéticas. Este método não é perfeito, porque não consegue selecionar as células onde ocorreram alterações mono-alelicas das bi-alelicas. Para resolver este problema é necessário ver o genoma das células alteradas. O método mais comum é o uso de PCR e/ou sequenciação do local manipulado da genoma. Desenham-se os primers à volta da região manipulada, ou um primer que fica fora da região e um que hibrida na sequência inserida por HDR.

Este trabalho teve como objetivo analisar possíveis diferenças nas funções da MOB1A e da MOB1B usando a técnica CRISPR/Cas9 em células humanas. O passo da deleção dos genes foi previamente feito por membros do nosso grupo. O meu trabalho consistiu na seleção dos clones nulos e caracterização dos fenótipos para os genes MOB1A e MOB1B.

Simultaneamente, houve um mini-projeto paralelo do gene ASP (ASPM) onde o objetivo foi a caracterização dos fenótipos durante mitose e citocinese nas células do cérebro de *Drosophila* e células humanas em cultura.

2. Materiais e Métodos

Todos os clones criados com técnica CRISPR pela transfecção das células HeLa que foram analisados neste estudo foram criados e selecionados pela Cláudia Florindo e pelo Ricardo Furtado.

2.1. Congelamento das células

Para guardar as linhas criadas e selecionadas essas foram congeladas e guardadas a -80°C em solução congelante (10% DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma), 10% SFB (Soro Fetal Bovino, Gibco® Life Technologies) em 1x tampão fosfato salino (PBS) pH 7.4 (Gibco® Life Technologies, sem CaCl₂ e sem MgCl₂) e 10% de meio DMEM completo (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - Gibco® Life Technologies)). Dentro da câmara de fluxo laminar *ThermoScientific MSC Advantage* as placas de cultura das células que tinham a confluência cerca de 80-90% foram lavadas com 1x PBS pH 7.4 duas vezes e a seguir foi adicionada tripsina-EDTA 0.5% (ácido etilenodiamino tetra-acético) a função da qual é a clivagem das proteínas envolvidas na adesão das células a superfície saltando-as e desagregando-as das superfícies das placas de cultura das células. Estas placas com a tripsina incubaram-se 3-5 minutos a 37°C na incubadora *ThermoScientific* e a seguir observaram-se a microscópio para garantir que todas as células se encontravam em suspensão. No passo seguinte foi adicionado o meio completo DMEM às células para diluir a tripsina e todo o conteúdo foi passado a um tubo Falcon 50ml (VWR®). A seguir, os tubos de Falcon com as células foram centrifugadas a 1000 rpm (rotações por minuto) na centrifugadora (*HiMac GT6EL*) durante 5 minutos. Entretanto foram preparados e identificados os tubos de criopreservação (VWR) nos quais foi apontado o nome da linha celular, a data de congelamento, o nome do operador e o número das células ou número de passagens efetuadas. Após a centrifugação as células ficavam coladas a fundo do tubo, o sobrenadante foi tirado e as células foram resuspendidas em solução congelante. O conteúdo foi dividido entre os tubos de criopreservação (1 ml por tubo) e imediatamente foram colocados em gelo durante 15 minutos. Depois os tubos de criopreservação foram enrolados muito bem em papel laboratorial e colocados no congelador (*ThermoScientific*) a -80°C durante 1 dia. No dia seguinte, os tubos de criopreservação foram colocados numa caixa e guardadas a -80°C até a análise das seguintes. Este processo foi feito lentamente com adição de DMSO para impedir a formação de cristais de água dentro das células. O DMSO serve como um anticongelante garantindo a lenta desidratação diminuindo a ruptura das células durante o processo da congelação.

2.2. Manutenção das linhas celulares

Devido a crescimento e expansão celular essas têm de ser passadas para novas placas de cultura das células com a troca do meio da cultura das células. Durante o crescimento as células fazem o metabolismo que faz com que o meio onde as células crescem fica mais ácido que por sua vez leva a alteração da cor do meio, de vermelho para laranja/amarelo, por causa da presença de vermelho do fenol que é um indicador de pH.

As células foram mantidas não placas de cultura das células de 60 mm na incubadora a 37°C, 21% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono. Em caso de necessidade de maior número de células para análise as seguintes foram crescidas nas placas de 100mm. As células foram observadas todos os dias para ver a confluência. Quando as células chegavam a 80% de confluência nestas foi feita a passagem para novas placas. Antes de começar a passagem das células a camara de fluxo laminar foi ligada 15 minutos antes de qualquer manipulação dentro e o PBS, meio de cultura das células e a tripsina foram aquecidos a 37°C em banho maria durante 15 minutos. Todo o material e reagentes têm de ser estéreis (autoclavados, filtrados ou passados por álcool 70%). O processo de passagem começou pela aspiração do meio de cultura das células antigo e com duas lavagens com PBS para tirar os restos do meio e as células mortas. Após a lavagem colocou-se 0.5 ml ou 1.5 ml de tripsina-EDTA 0.5% nas placas de 60 mm ou

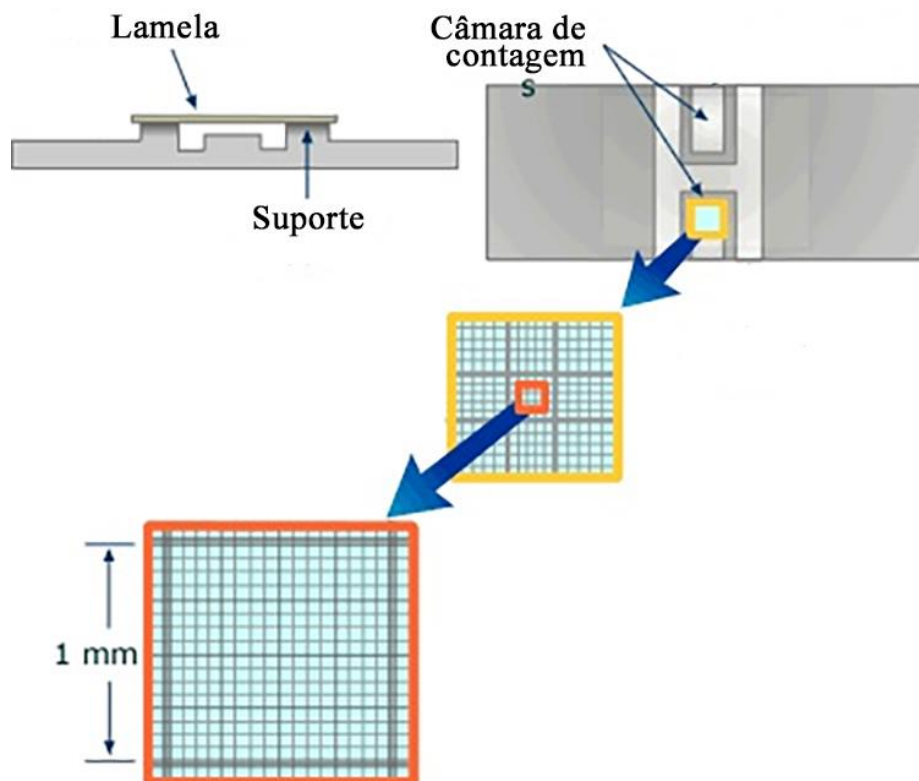


Figura 2.1. Contagem das células na câmara de Neubauer. A contagem foi feita contando as células dentro do quadrado do meio de 1 mm² de área.

100 mm respetivamente e incubou-se 3-5 minutos dentro da câmara a 37°C. A seguir, as células foram observadas no microscópio para garantir a desagregação do fundo das placas e entre elas próprias. Adicionou-se o meio da cultura para diluir a tripsina. No caso em que era necessário, as células foram contadas numa câmara de Neubauer. As células foram bem resuspendidas em meio e pipetou-se 10 µl do meio com células para a câmara de Neubauer 0.0025 mm². Depois da contagem das células no microscópio as células foram passadas em quantidade desejada para as novas placas com adição do meio da cultura novo no volume final de 5 ml para as placas de 60 mm e 10 ml para as placas de 100 mm. No final as placas foram agitadas lentamente em varias direções para garantir o espalhamento homogéneo das células e depois as placas foram colocadas na incubadora a 37°C, 21% de oxigénio e 5% de dióxido de carbono.

2.3. Descongelamento das células

Antes de começar os descongelamentos das células os reagentes foram aquecidos a 37°C em banho maria e a câmara de fluxo laminar foi ligada 15 minutos antes. Todas as células dos clones criados e selecionadas por Ricardo Furtado e Cláudia Florindo foram guardadas a -80°C. Para descongelamento os crio-tubos que continham as células foram rapidamente aquecidos a 37°C em banho-maria. A seguir, estes tubos foram centrifugados a 1000 rpm durante 5 min. Dentro da câmara do fluxo laminar o sobrenadante foi rapidamente tirado e as células foram resuspendidas em DMEM completo e rapidamente semeadas nas placas de cultura das células. Este processo tem de ser realizado rapidamente porque o DMSO é tóxico para as células. No final, as células foram colocadas na incubadora a 37°C, 21% de oxigénio e 5% de dióxido de carbono. No dia seguinte, o meio foi trocado para tirar as células mortas e os restos do DMSO.

2.4. Preparação de lisados proteicos

Para preparar os lisados proteicos ou de DNA as células foram semeadas nas placas de 60 ou 100mm (dependendo da quantidade desejada) até terem no mínimo 80% de confluência. Quando era necessário as células foram quantificadas antes de fazer lise celular como foi anteriormente descrito numa câmara de Neubauer.

Na preparação de lisados proteicos sem quantificação tirou-se o meio de cultura das placas e essas foram lavadas duas vezes com PBS para tirar os restos do meio e as células mortas. Depois, pipetou-se o tampão de lise (100 mM NaF, 1 mM NaVO₄, 1% Triton X-100, 1x PBS) nas placas com adição de 1x inibidor de proteases completo (Roche) para impedir a

degradação das proteínas (200ul para as placas de 60mm e 500 µl para as placas de 100mm). Com um raspador, raspou-se toda a superfície da placa e o lisado obtido pipetou-se para um tubo de microcentrifugação e colocou-se no gelo durante 30 minutos. A seguir, os tubos foram centrifugados na centrífuga refrigerada (VWR HiMac CT15RE) a uma velocidade máxima (21500 g) durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi pipetado para o novo tubo de centrifugação e foi adicionado, em volume igual a lisado, o *Loading Buffer* 4x (50 mM Tris-HCl pH 6.8, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,1%, SDS 2%, 100mM β-Mercaptoethanol). Os tubos com a amostra e o *Loading buffer* foram fervidas a 95°C durante 5 minutos para desnaturar as proteínas e a seguir os tubos foram colocados no gelo. Em caso de grande viscosidade das amostras, devido à presença de moléculas de DNA, estas foram vórticadas.

Nas experiências onde foi necessário ter níveis proteicos normalizado foi feita a contagem das células para garantir o número das células igual de todos os clones e do controle. Para tal objetivo, depois das lavagens com PBS descritas anteriormente foi adicionada a tripsina. Passando 5 minutos as células foram resuspendidas em 3 ml de meio de cultura das células e foram contadas. A seguir a quantidade necessária foi pipetada para os tubos de Falcon 15 ml. Os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 1000 rpm e o sobrenadante foi descartado. As células foram resuspendidas em 1 ml de PBS e passadas para o tubo de microcentrifugação com a seguinte centrifugação a 1000 rpm 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 200 µl de tampão de lise por 10⁶ de células. Os próximos passos são iguais da preparação de lisado descrita anteriormente.

2.5. Extração e purificação do DNA

Para extrair o DNA das células tirou-se o meio de cultura das placas e essas foram lavadas duas vezes com PBS para tirar os restos do meio e as células mortas. Depois, pipetou-se o tampão de lise (50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.45% NP-40, 0.45% Tween-20). Com o raspador raspou-se a superfície toda e o lisado foi passado para o tubo de microcentrifugação. Adicionou-se Proteinase K (Sigma) na concentração final de 100ug/ml para degradar as proteínas coladas ao DNA. O lisado foi deixado 10 minutos a temperatura ambiente e a seguir os tubos foram colocados em banho seco (ThermoFisher) a 55°C durante 3 horas e foram agitados periodicamente. A seguir, os tubos foram colocados no banho seco a 95 °C durante 20 minutos para desativar a proteinase K. Depois os tubos foram

centrifugados a 16000 g durante 1 minuto para precipitar os compostos insolúveis e o sobrenadante foi usado para análise no PCR.

Em caso de necessidade o DNA ainda foi purificado. Para isto depois de ultimo passo adicionou-se fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (49.5:49.5:1, Sigma) no volume igual da amostra. A seguir os tubos foram vórticadas até formar emulsão branca e foram centrifugadas a 16000 g durante 2 minutos para separar as fases. Após a centrifugação, devia-se formar três camadas – fase aquosa (em cima), fase oleosa (por baixo) e camada de proteínas entre outras duas camadas. Transferiu-se cuidadosamente a camada aquosa para um novo e adicionou-se o clorofórmio no volume igual da amostra, vórticou-se durante 5 segundos e centrifugou-se durante alguns segundos. Como o fenol é pouco solúvel em água e muito solúvel em clorofórmio este passo permite tirar os restos do fenol da amostra. A seguir, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de microcentrifugação e adicionou-se isopropanol no volume igual ao da amostra. Os tubos foram agitados suavemente e colocados em gelo durante 10 minutos para aumentar a precipitação do DNA. Após este processo, os tubos foram centrifugados a 13200 g a 4°C durante 15 minutos. No fundo dos tubos devia-se formar um pellet branco. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado 2 vezes com etanol 70%. Quando o pellet descolava-se do fundo, os tubos foram novamente centrifugados a 13200 g durante 5 minutos. Após a lavagem, o sobrenadante descartava-se e os tubos foram deixadas na banca com tampa aberta para que o álcool evaporava-se. No final, o pellet foi resuspenso em tampão Tris-EDTA pH 8.5 ou em água MilliQ (Millipore) e deixado durante a noite no frigorífico a 4°C para solubilizar o DNA.

2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western blotting*

Western-blot é uma técnica muito importante e uma das mais usadas na biologia celular e molecular que permite identificar proteínas específicas a partir de uma mistura complexa de proteínas extraídas das células. Esta técnica é constituída por três passos: separação das proteínas por peso molecular num gel de acrilamida, transferência destas proteínas para um suporte solido (geralmente membranas de nitrocelulose ou PVDF) e imunodeteção com os anticorpos primário e secundário para visualização a proteína de interesse.

A separação das proteínas é feita pelo eletroforese no gel de acrilamida pois foi esse o protocolo estabelecido no nosso laboratório. Assim, foram utilizados o tampão Tris-HCl 1 M a pH 6.8, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, solução de acrilamida a 30% (acrilamida:bis-acrilamida 29:1, Biorad), SDS (Dodecil sulfato de sódio) a 10% que rompe as ligações não-covalentes das

proteínas, causando a sua desnaturação, deste modo, a separação não é influenciada pelas formas estruturais distintas entre as proteínas e faz com que estas adquiram a carga negativa permitindo a separação proteica a resposta ao impulso elétrico, água destilada (dH₂O), PSA (persulfato de amónia) a 10% que é um agente oxidante que fornece os radicais livres para iniciar a reação de cadeia da polimerização de acrilamida:bis-acrilamida, TEMED (Tetramethylethylenediamine, Sigma) que acelera a formação de radicais livres a partir de persulfato assim catalisando a polimerização. Desta forma, ocorre a polimerização de acrilamida formando um gel poroso que permite a separação de proteínas pelo seu peso molecular, as proteínas com pequeno peso molecular correm no gel mais rapidamente do que as proteínas maiores.

O gel de acrilamida é dividido em duas partes: gel de concentração e gel de resolução. As receitas para estes géis são iguais, apenas a concentração final de acrilamida e o tampão que se usava foram diferentes – Anexo I. No gel de concentração usa-se o tampão Tris-HCl com pH 6.8 enquanto o pH do tampão de corrida é 8.3, esta diferença permite aos aniões da glicina e aos aniões de cloreto empacotar e juntar as proteínas antes que eles entrem no gel de resolução, onde elas iniciam a corrida ao mesmo tempo. O gel de concentração usado foi de 5% de acrilamida e a percentagem de acrilamida no gel de resolução variava consoante a proteína em estudo (entre 8% e 15%). Depois de limpar e montar o suporte (Biorad) pipetou-se o gel de resolução que foi coberto por camada de dH₂O para impedir a passagem do oxigénio que é um inibidor de polimerização e deixou-se polimerizar durante meia hora. A seguir tirou-se a água e pipetou-se o gel de concentração por cima do gel de resolução e introduziu-se o pente para formar os poços deixando polimerizar durante meia hora. Preparou-se o tanque de corrida com o tampão de corrida. Depois de colocar o gel no tanque tirou-se o pente e lavaram-se os poços com o tampão para tirar os restos de acrilamida que polimerizou. Pipetou-se o marcador do peso molecular *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (ThermoScientific) e as amostras previamente preparadas para carregamento no gel. A quantidade de amostra pipetada variava da grossura do gel (entre 10 µl e 40 µl).

Para a eletroforese aplicou-se uma corrente de 15 mA, por cada gel no tanque, permitindo a passagem das amostras no gel de corrida. até 30 mA no gel de corrida. Após a entrada das amostras no gel de corrida a corrente foi aumentada para 30 mA por cada gel até o fim da corrida.

Uma vez separadas pelo peso molecular as proteínas têm de ser transferidas para a membrana PVDF (Polyvinylidene fluoride) 0.2 μm (GE Healthcare Life Sciences) que representam uma copia do gel e onde permanecem imobilizados para a seguinte análise. Para a transferência foi montado uma “sandwich” numa cassette de montagem onde o gel coloca-se junto à membrana de PVDF (previamente ativada em metanol, reidratada e equilibrada em tampão de transferência), envolvidos em papel *Whatman* e esponjas como é representado na figura 2.2.

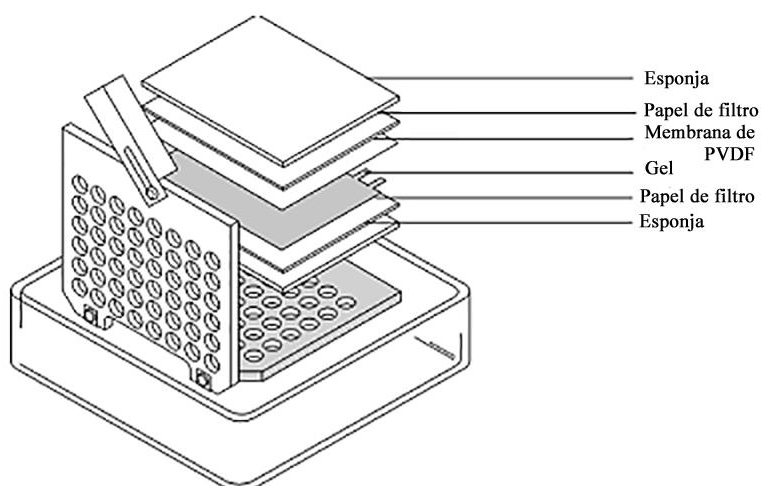


Figura 2.2. Esquema da montagem de uma sandwich da transferência no tanque.

Após a montagem da cassette, esta foi colocada no tanque, certificando que a membrana está localizada no polo positivo, e adicionou-se o tampão de transferência (sem metanol e sem SDS) fresco e colocou-se uma placa de gelo. A corrente que foi aplicada variou dependendo de proteína em estudo (250 mA ou 500 mA) durante uma hora.

Terminando a corrida, a membrana foi bloqueada com leite em pó magro 10% em TBS-T (tampão Tris salino – Tween-20 0.05%) durante 1 hora, a temperatura ambiente com a suave agitação para impedir a ligação inespecífica dos anticorpos a membrana. Após o bloqueamento da membrana, esta foi lavada 3 vezes de 5 minutos com leite em pó magro 1% em TBS-T. A membrana foi incubada com anticorpo primário diluído em TBS-T com leite em pó magro 1% ou BSA (albumina de soro bovino) 5% entre 1 hora ou durante a noite à temperatura do ambiente ou a 4°C respetivamente. Após a incubação com anticorpo primário foram feitas mais 3 lavagens de 5 minutos com leite em pó magro 1% em TBS-T e a seguir a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado à HRP (*Horseradish peroxidase*) específico

para o animal no qual foi produzido o anticorpo primário. Incubou-se durante 1 hora a temperatura do ambiente e fizeram-se mais lavagens 3 vezes como previamente descrito, outra lavagem só com TBS-T e a última com TBS durante 5 minutos.

Para visualizar as bandas, a membrana foi incubada 1 minuto com a solução ECL (*enhanced chemiluminescence*) misturada com peróxido de hidrogénio e numa sala escura foi revelada num filme (GE Healthcare Life Sciences).

Tabela 2.1. Lista de anticorpos primários utilizados

Anticorpos Primários		
Anticorpo	Descrição e Referência	Fornecedor
ASPM K-17	Cabra, IgG sc-48883	SantaCruz Biotech
ASPM K-18	Cabra, IgG sc-48884	SantaCruz Biotech
α -Tubulina DM1A	Ratinho, IgG T6199	SigmaAldrich
MOBK4B (MOB1A)	Coelho, IgG ab199908	Abcam
β -Tubulina 2.1	Ratinho, IgG T4026	SigmaAldrich

Tabela 2.2. Lista dos anticorpos secundários utilizados

Anticorpos Secundário		
Anticorpo	Descrição e Referência	Fornecedor
Anti-ratinho Alexa594 IF	Cabra, ab150116	Abcam
Anti-coelho-HRP	Cabra, IgG #111-035-144	Jackson ImmunoResearch
Anti-ratinho Alexa594	Cabra, IgG #A11032	Invitrogen
Anti-cabra-HRP	Coelho, A5420	Sigma

2.7. Miniprep dos plasmídeos e extração do DNA de agarose

Para aumentar a quantidade dos plasmídeos do CRISPR/Cas9 foram transfetadas as células competentes de *Escherichia coli*, que foram previamente preparadas e congeladas a -80°C pela Cláudia Florindo. Todos os procedimentos com as bactérias foram feitos à volta do bico de Bunsen no ambiente, materiais e reagentes estéreis. Antes da transfecção, prepararam-se as placas de Petri com meio LB (Lysogeny Broth) contendo o antibiótico (ampicilina). Derreteu-se o agar com LB sem deixa-lo ferver e adicionou-se ampicilina numa concentração final de 100 µg/ml. O agar foi espalhado por várias placas de Petri e deixou-se a solidificar. As células competentes tratadas com CaCl₂ foram descongeladas e adicionou-se 2 µl do DNA (plasmídeos de interesse) deixando no gelo 20 minutos para deixar os íões de Cálcio neutralizar a membrana e o DNA que têm a carga negativa. Depois, as células foram submetidas ao choque térmico. As células foram colocadas no banho maria a 42°C durante 45 segundos para alterar a fluidez da membrana que, por sua vez, aumenta a eficiência da transfecção. Após o choque térmico as células foram colocadas no gelo durante 3 minutos e ,a seguir, adicionou-se 400 µl do meio LB sem antibiótico, deixando incubar na câmara a 37°C com agitação durante 30-60 minutos. Depois da incubação, pipetaram-se e espalharam-se 100 µl do meio contendo as células transfetadas nas placas previamente preparadas. As placas foram deixadas na incubadora a 37°C sem agitação durante a noite. No dia seguinte, as colónias escolhidas aleatoriamente foram picadas e transferidas para meio LB sem agar com ampicilina e deixaram-se a crescer durante a noite a 37°C com agitação forte (200 rpm).

A extração dos plasmídeos foi feita seguindo as instruções do fabricante do *kit QIAprep spin miniprep (250)* que foi periodicamente usado no nosso laboratório.

Para extrair os fragmentos do DNA do PCR foi corrido o gel de agarose 1% (SeaKem) com as amostras do PCR do interesse até o marcador percorrer 50% do gel. Após a corrida, o gel foi visualizado no GelDoc XR+ (Biorad) com um vidro de proteção, e com bisturi foram cortadas e transferidas, para os tubos de microcentrifugação, as bandas de interesse. A seguir, as bandas foram purificadas seguindo as instruções do fabricante do *kit QIAEXII gel extraction kit (150)* que foi periodicamente usado no nosso laboratório.

2.8. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O PCR é uma das técnicas mais abundantes nos laboratórios que permite rápida ampliação dos fragmentos do DNA de interesse que podem ser usadas para sequenciação,

clonagem, análise de expressão genica e mutagénese. A técnica consiste na utilização dos mecanismos da replicação *in vitro*.

Para o PCR funcionar, é necessário um termociclador - uma maquina que permite rápida alteração das temperaturas dentro dos tubos, a *Taq* polimerase – é uma polimerase de DNA termo estável, os dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos) - que são as bases azotadas ligadas com um três fosfato, os oligonucleotídeos que definem a região do genoma que tem de ser amplificada, o tampão que fornece os iões necessários para reação funcionar e o DNA, a partir de qual irão amplificar os fragmentos. O termociclador faz os ciclos de temperatura pré-estabelecidos com tempos exatos específicos para cada reação.

As reações do PCR foram realizadas com uso da polimerase DreamTaq (ThermoFisher) onde foram seguidas as instruções do protocolo do fabricante. Sempre foram preparadas as misturas principais (*master mix*) onde juntaram-se por cada tubo de reação 14.9 µl de água MilliQ, 1 µl de tampão DreamTaq (ThermoFisher), 1 µl de dNTPs (2 mM de cada tipo, Invitrogen) e 0.1 µl de DreamTaq. A seguir, esta mistura foi dividida pelos tubos de PCR (ThermoFisher). Os oligonucleotídeos (10 mM, *forward* e *reverse*) e o DNA foram pipetadas, 1 µl de cada, individualmente em cada tubo de reação com volume final de 20 µl. Antes de por os tubos no termociclador (C1000™ Touch, BioRad) essas foram agitadas para misturar os reagentes e centrifugadas.

A reação sempre começou com um passo de desnaturação inicial durante 3 minutos a 95°C seguida de 30 ciclos de 95°C durante 45 segundo, de 50°C até 60°C durante 30 segundo (a temperatura variava com a temperatura anelamento dos primers (tab. 2.1)), 72°C durante 60 segundos (o tempo variava com o tamanho do fragmento da ampliação) e com um passo final de alongação a 72°C durante 5 minutos.

Tabela 2.3. A lista dos primers utilizados

Nome	Sentido	Sequência (5'-3')
RF1	<i>Forward</i>	TGTCTCAAGGGTTCAGCTAAGAACC
RF2	<i>Reverse</i>	AATCACCTTCACACAAACGGATAAC
RF3	<i>Forward</i>	GGTCTAATGCTTGGTGAATGACTCTATTG
RF4	<i>Reverse</i>	TGGGTGACTGAGTGAGACCCTGTCTC
SA3	<i>Forward</i>	GATGAAGGCTTTGCTGCCGTACATG
SA4	<i>Reverse</i>	ACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAA
SA5	<i>Forward</i>	TGGATGGAGAGCACAGTAGTTA
SA6	<i>Reverse</i>	TAGAATGGACAGCACCAACACT
ASP upper	<i>Forward</i>	AACCATTCTGAAGACCCCTAACAT
ASP lower 2	<i>Reverse</i>	CAGCTTGCACAAAATCGTATCG
ASP lower 3	<i>Reverse</i>	TCGAGCGGATTTTCATTTTCAT
U6	<i>Forward</i>	ACTATCATATGCTTACCGTAAC

Tabela 2.4. Temperatura de anelamento dos primers usado no PCR

Par de primers	Temperatura de anelamento °C
RF1+RF2	50 °C
SA5+SA6	60 °C
RF3+RF4	Gradiente de 67.5°C, -0.5°C por cada ciclo
RF1+SA3	55 °C
RF2+SA4	55 °C
SA5+SA3	55 °C
SA6+SA4	55 °C
Up+Low2	55 °C
Up+Low3	55 °C

2.9. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose é uma técnica que permite a separação de moléculas como o DNA pelo seu comprimento. Esta separação é feita pela corrente elétrica onde o DNA que tem a carga negativa vai migrar para o polo positivo. Assim preparou-se o gel de agarose de 1% em tampão TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM ácido etilenodiamino tetraacético) e aqueceu-se nas micro-ondas até que a solução começou a ferver, este passo é necessário porque a temperatura de fusão da agarose é de 90°C. Após a dissolução da agarose, a solução foi refrigerada até 60°C e foi adicionado o corante do DNA (GelRed x10000, Biotium) e misturou-se. Foi montada a cassete e introduziu-se o pente, no final despejou-se a solução de agarose para dentro. Deixou-se solidificar o gel durante 45 minutos e depois passou-se para o tanque de eletroforese, encheu-se com o tampão TAE até cobrir o gel e retirou-se o pente.

Nas amostras de DNA, foi adicionado o tampão de DNA 4X (30% glicerol, 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xylene cyanol FF) até à concertação final de 1X. Pipetou-se 4 µl do marcador GeneRuler DNA Ladder Mix (ThermoFisher) e 10 µl das amostras em cada poço, ligou-se o gerador a 50V ou 75V (dependendo do tamanho do tanque) durante 1 hora. Após a corrida o gel, foi visualizado e fotografado no GelDoc XR+ (Biorad).

2.10. Imunofluorescência das células

De forma a analisar as anomalias nas células foi usada a imunofluorescência como um método de análise. Para fazer a imunofluorescência das células foram semeadas as células HeLa nas placas de 24 poços no máximo e foram semeados 12 poços por placa. As células foram contadas na câmara de Neubauer e semeadas 50000 células por poço no meio DMEM. Antes de semear as células, foram colocadas as lamelas de 12 mm de diâmetro nos poços onde deveriam ser semeadas as células, para que as células crescessem por cima das lamelas. No dia seguinte, as células foram fixadas.

2.10.1. Fixação em Metanol/Acetona

Todos os passos da fixação foram realizados na bancada a temperatura do ambiente e foram feitas muito rapidamente para prevenir a degradação dos microtúbulos dentro das células. Retirou-se o meio DMEM das células e lavaram-se os poços com tampão 30% PEM (0.1 M PIPES pH 6.95, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄) Glicerol (Sigma) a 38°C durante alguns segundos. Após a lavagem pipetou-se a solução Metanol/Acetona previamente refrigerada a -

20°C e deixou-se fixar durante 2 minutos. Quando a fixação acabou, descartou-se a solução e os poços com células foram lavadas três vezes com o tampão PBS (Sigma) durante 5 minutos por lavagem. Depois das lavagens, pipetou-se o tampão PBS com Triton X-100 a 0.5% para permeabilizar as células durante 10 minutos e a seguir lavaram-se como foi descrito anteriormente. O anticorpo primário, que é específico contra a proteína de interesse, foi diluído 1/200 na solução da diluição dos anticorpos (1% soro fetal bovino, 0.05% Tween-20, PBS) e foi pipetado nas lamelas com as células. Os poços vazios da placa foram preenchidos com água e foi deixado a incubar durante 1 hora. Este e os próximos passos das incubações foram feitos numa câmara escura e húmida. Quando terminou a incubação, os poços foram igualmente lavados e pipetou-se o anticorpo secundário, que é feito contra o animal no qual foi feito o anticorpo primário, diluído 1/500 na solução da diluição dos anticorpos e deixou-se a incubar durante 30 minutos. O anticorpo secundário é conjugado com o fluorocromo que imite a luz visível quando é excitado. Neste passo e nos passos a seguir as amostras foram protegidas da luz. Depois da incubação e sucessivas lavagens com o PBS, pipetou-se o DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) na concentração final de 0.25 µg/ml e incubou-se durante 10 minutos com as últimas 3 lavagens no final. Em todos os passos das incubações é muito importante não deixar as lamelas a secar. Retiraram-se as lamelas dos poços das placas com uma pinça fina e montaram-se por cima das lamelas no meio de Mowiol (mowiol, glicerol, Tris-HCl pH 8.5, DABCO, dH₂O), com um Whatman retirou-se o excesso do meio de montagem e deixou-se solidificar durante a noite. No dia seguinte as lamelas foram visualizadas no microscópio com a luz fluorescente (Zeiss AxioImager Z2).

2.10.2. Fixação em formaldeído

Antes de fazer a fixação, foi preparada a solução de formaldeído 3.7% em PBS e aqueceu-se até 38°C. Depois de descartar o meio DMEM das células e lavar com o tampão PEM a 37°C, pipetou-se a solução de formaldeído a 37°C e colocou-se a placa dentro da câmara quente a 37°C durante 10 minutos. Todos os passos a seguir são iguais à de fixação com a metanol/acetona.

2.11. Dissecção dos cérebros das larvas de *Drosophila melanogaster*

A dissecção das larvas foi feita para estudar os defeitos mitóticos nos cérebros dos mutantes de ASP, nomeadamente os mutantes escolhidos eram ASP¹⁹⁵/ASP⁴. Para este objetivo as moscas adultas foram passadas para novo tubo com a comida com a finalidade de ter só as

larvas no tubo. As larvas de estágio três do desenvolvimento foram escolhidas para a dissecação dos cérebros. Antes de tirar a larva, pipetaram-se várias gotas de PBS na lamina. Tirou-se a larva

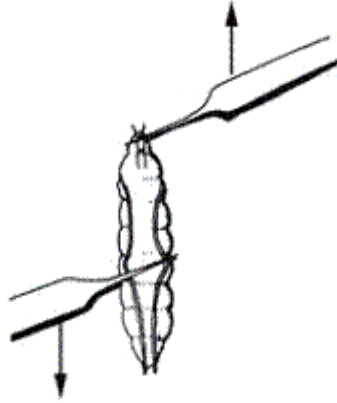


Figura 2.3. Demonstração da dissecação da larva de *Drosophila melanogaster*.

do tubo com pinça de dissecação e colocou-se na primeira gota de PBS para lavar os restos da comida que estão coladas na larva. Depois de lavagem, a larva foi passada para a gota seguinte. Todo o processamento a seguir foi feito na lupa. Com duas pinças de dissecação agarrou-se a larva, com uma pinça da zona da boca e com outra na zona do meio, como esta ilustrado na imagem X. A seguir, agarrando a larva, puxaram-se as pinças para os lados opostos. O cérebro tem de estar agarrado à estrutura da boca – as mandíbulas, glândulas salivares e discos imaginários.

A seguir, tudo o que ficou colado à estrutura da boca, passou-se para outra gota para limpar o cérebro das estruturas secundárias, passando o cérebro de gota a gota para obter o cérebro o mais limpo possível.

2.12. Passagem de moscas

As moscas foram periodicamente passadas para os novos tubos com a comida (receita comida) quando era detetada a contaminação dos fungos ou até a comida no tubo terminava. Além disso, quando a papa ficava seca, adicionavam-se algumas gotas de água destilada. Para passar as moscas tirava-se a rolha do novo tubo, a seguir o tubo que tinha de ser passado bateu-se com o fundo na mesa ou tapete especial para que todas as moscas caíssem no fundo. Depois rapidamente tirava-se a rolha do tubo com as moscas e virava-se para o novo tubo. No final,

fechava-se o tubo com a rolha e passava-se a identificação do tubo antigo para o novo tubo. O tubo antigo descartava-se, em caso de necessidade guardava-se para ampliar o *stock*.

2.13. Imunofluorescência dos cérebros de *Drosophila melanogaster*

De forma a analisar as anomalias nas divisões celulares foi usada a técnica de imunofluorescência nos cérebros das larvas do terceiro estágio do desenvolvimento de *D. melanogaster*, porque nos cérebros há um grande índice mitótica durante o desenvolvimento da larva que torna este órgão o melhor para o estudo das mitoses.

Quando acabava a dissecação de larva, sem esperar realizava-se a fixação, para isto o cérebro foi colocado numa solução de formaldeído 3.7% em PBS a temperatura do ambiente durante 20 minutos. Todos os passos das incubações e lavagens foram realizados nos vidros de relógio. Após a incubação, foi feita a lavagem em PBS durante 30 minutos com seguida permeabilização durante 10 minutos em PBS contendo 0.3% de Tween-20. A seguir, os cérebros foram bloqueados, para impedir a ligação inespecífica dos anticorpos, durante 1 hora. O próximo passo foi a incubação com anticorpo primário diluído 1/200 em PBST (PBS com 0.1% Tween-20) durante a noite. No dia seguinte, lavou-se em PBST durante 30 minutos e incubou-se com o anticorpo secundário diluído 1/500 em PBST com 10% de soro fetal bovino durante 2 horas. Os cérebros foram lavados novamente em PBST durante 30 minutos e ainda incubaram-se em DAPI 0.25 µg/ml durante 30 minutos. A última lavagem depois de DAPI foi de 15 minutos em PBST. A montagem foi feita em Mowiol. Para isto foi pipetado o Mowiol nas lamínas e colocaram-se 3 cérebros por cada gota. No final colocou-se a lamela por cima com muito cuidado para impedir a formação das bolhas e não esmagar os cérebros. As lamínas foram deixadas durante a noite para solidificar.

3. Resultados

3.1. Análise dos clones CRISPR de MOB1A e MOB1B

Os genes MOB1A e MOB1B podem ter as funções diferentes e comuns nas células (Florindo e Tavares, dados não publicados). Uma das maneiras de analisar a função do gene é fazer a deleção do gene para estudar as alterações nas células (ver o fenótipo). O primeiro objetivo deste projeto era a criação e a seleção dos clones nulos e heteroalelico de MOB1A e MOB1B usando a tecnologia CRISPR. A aplicação da tecnologia CRISPR para criar as linhas nulas e o isolamento de colónias foi realizado no nosso laboratório, pelo Ricardo Furtado e Cláudia Florindo, utilizando o método da Santa Cruz Biotech (SCBT) CRISPR/Cas9-*directed Double Strand Break* (DBS) junto com um plasmídeo que permite recombinação homóloga (HDR). Os clones potencialmente positivos foram isolados com anéis de vaselina. Foram estes clones isolados, denominados RFA para MOB1A e RFB para MOB1B, que utilizei no meu projeto.

3.2. Análise dos clones CRISPR do MOB1A

De modo a determinar que linhas clonais RFA tinham a inserção, obtidas pela aplicação da CRISPR, realizou-se uma abordagem por PCR. Foi escolhido o PCR, porque é um método que permite analisar a região genómica de interesse.

A sequência do HDR contém o gene que codifica para o RFP (proteína vermelha fluorescente) e a sequência que dá resistência a puromicina (droga usada para seleção dos clones com a inserção). Os gRNA (*guide RNA*), que guiam a maquinaria do CRISPR para o sítio escolhido não são igualmente eficientes em todos os locais do genoma. O mesmo gRNA desenhado para vários locais do genoma pode funcionar melhor num local do que no outro. Este facto pode ser explicado por heterogeneidade da cromatina e a variação da sua conformação. Por CRISPR, e segundo o método que utilizamos, pode haver três zonas de inserção do HDR. Consoante o comerciante (SCBT) as três regiões do CRISPR aumentam a eficácia da técnica aumentando a probabilidade de obter um clone nulo.

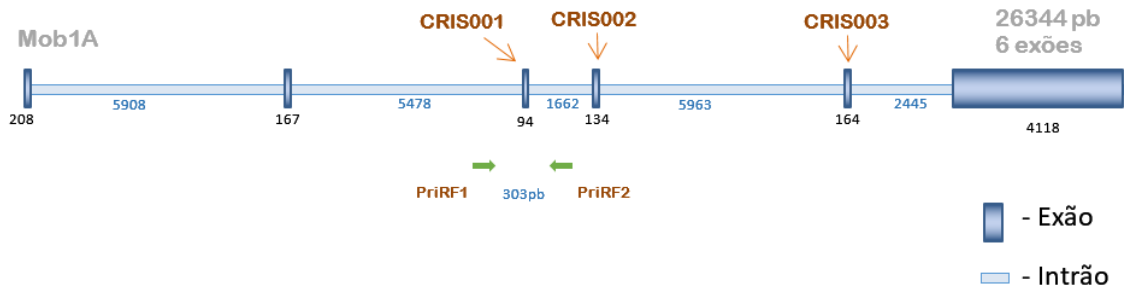


Figura 3.1. Representação gráfica dos locais da região genômica do MOB1A onde o CRISPR/Cas9 devia fazer os cortes de cadeia dupla e onde sequencialmente os plasmídeos do *knock-in* deviam inserir. Estas zonas foram denominadas CRIS. O primer PriRF1 é *forward* e o PriRF2 é *reverse*, e hibridam a volta da região onde o plasmídeo HDR deve inserir. As setas verdes representam a região onde os primers hibridam.

Nós só estávamos interessados em isolar linhas em que as alterações introduzidas na região genômica mais próxima do início do gene (CRIS001 na fig. 3.1). As outras duas zonas de alteração por CRISPR (CRIS002 e CRIS003 na fig. 3.1) não nos interessavam neste ponto do trabalho. Isto porque mesmo ocorrendo aí deleção/mutação do gene, a célula poderia produzir formas truncadas da proteína MOB1A. Por esta razão, analisei os clones RFA por PCR do genoma com os primers RF1 (5'- TGTCTCAAGGGTTCAGCTAAGAACC) e priRF2 (5'- AATCACCTTCACACAAACGGATAAC), desenhados para a região da alteração CRIS001 (Figura 3.1). Analisei 39 linhas clonais do RFA. De cada linha foi extraído, purificado e congelado o DNA genômico, para análise por PCR.

Os resultados que obtive do primeiro grupo dos clones (Figura 3.2) por PCR dos clones isolados por Ricardo Furtado fiz com os primers RF1 e RF2 (fig. 3.1). No caso de ocorrer a inserção do plasmídeo na região CRIS001 o tamanho do fragmento ampliado por PCR ficara

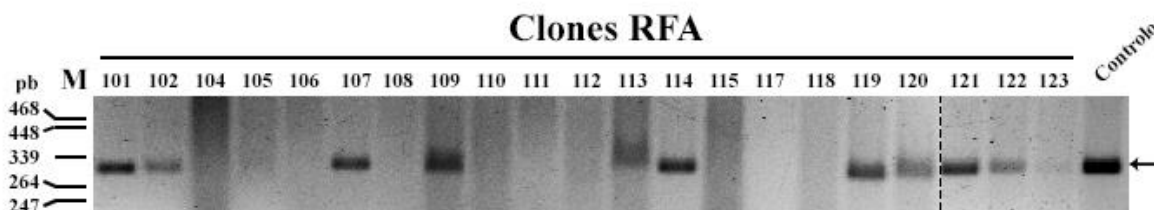


Figura 3.2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos do PCR dos clones RFA isolados pelo Ricardo Furtado com os primers RF1 e RF2. No caso de haver inserção não se deteta nenhuma banda, porque o tempo da extensão programado no termociclador não permite acabar a síntese do produto do PCR. Os números indicam os nomes dos clones. A seta indica o tamanho do fragmento normal, sem inserção do HDR. Controle – DNA das células HeLa. M - Marcador λ PstI.

de 3 Kb (fig. 3.7 B). O produto do fragmento ampliado das células HeLa sem inserção (fig. 3.2 – controlo) é de 303 pb. O tempo da extensão no termociclador foi programado de maneira de não deixar a reação do PCR acabar a síntese dos fragmentos superiores a 1 Kb. Foi dado 1 minuto para Taq polimerase usada para produzir o fragmento de 303 pb. No entanto, a velocidade máxima de Taq usada é 2 Kb por minuto, ou seja, no período do tempo dado a Taq não consegue produzir fragmento de 3 Kb.

Os resultados que obtive nas reações do PCR, indicados na figura 3.2, aparece em alguns clones a banda nos 303 pb indicando que não houve inserção do HDR. Nos clones 104, 105, 106, 108, 110, 111, 112, 115, 117, 118 e 123 onde não se deteta a banda nos 303 pb (fig. 3.2) são assim possíveis clones com inserção nos dois cromossomas. Para confirmar estes resultados repeti o protocolo para os clones onde não detetei a banda de 303 pb, ou seja, nos possíveis clones nulos.

O PCR realizado para confirmar os resultados anteriores (fig. 3.3) demonstrou que nalguns poços dos clones analisados se detetou a banda nos 303 pb, ou seja, não ocorreu a inserção do HDR na genoma no local analisado (CRIS001).

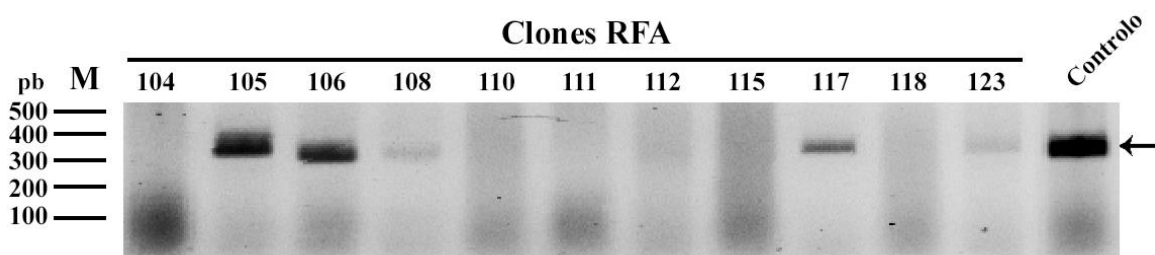


Figura 3.3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos do PCR dos clones RFA selecionados com os primers RF1 e RF2. No caso de haver inserção não se deteta nenhuma banda, porque o tempo da extensão programado no termociclador não permite acabar a síntese do produto do PCR. Os números indicam os nomes dos clones. A seta indica o tamanho do fragmento normal, sem inserção do HDR. Controlo – DNA das células HeLa. M - Marcador GeneRuler 1Kb.

Os resultados obtidos do PCR nos poços dos clones RFA – 110, 111, 112, 115, 118 não deram confiança. A razão é o arrastamento do produto do PCR nestes poços. Uma das possíveis razões era a possível degradação do DNA dos clones usados para realizar o PCR. Para excluir esta hipótese as células destes clones foram descongeladas e colocadas a crescer. As células congeladas do clone RFA 104 não foram encontradas no congelador. Depois de obter número suficiente de células, uma parte foi recolhida para extrair o DNA e outra parte foi novamente

congelada. O protocolo foi repetido com o novo DNA extraído dos clones RFA – 110, 111, 112, 115, 118.



Figura 3.4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos do PCR dos clones RFA (110, 111, 112, 115, 118) com os primers RF1 e RF2. No caso de haver inserção não se deteta nenhuma banda, porque o tempo da extensão programado no termociclador não permite acabar a síntese do produto do PCR. Os números indicam os nomes dos clones. A seta indica o tamanho do fragmento normal, sem inserção do HDR. Controle – DNA das células HeLa. M - Marcador GeneRuler 1Kb.

Nos poços dos clones RFA 111, 115, 110 e 112 apareceu a banda nos 303 pb. O poço do clone RFA 118 é único que não apresentou nenhuma banda. Para confirmação final da inserção do HDR do clone RFA 118 purificou-se o mesmo DNA extraído com fenol e repetiu-se o protocolo do PCR (figura 3.5).

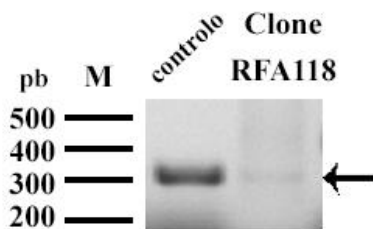


Figura 3.5. Eletroforese em gel de agarose dos produtos do PCR do clone RFA 118 feito a partir do DNA purificado com os primers RF1 e RF2. No caso de haver inserção não aparece nenhuma banda, porque o tempo da extensão programado no termociclador não permite acabar a síntese do produto do PCR. Controle – DNA das células HeLa. M - Marcador GeneRuler 1Kb. A seta aponta para a banda pouco visível.

Com o DNA purificado do clone RFA 118 verificou-se que o poço apresenta uma banda no tamanho previsto de 303 pb, que sugere que este clone não tem a inserção do HDR nos dois cromossomas. Assim de todos os 40 clones RFA analisados do primeiro grupo de clones não se obteve nenhum clone homoalelico para a inserção de MOB1A.

Vários clones analisados (fig. 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5) têm o tamanho de banda alterado relativamente ao controle. Esta informação indica que possivelmente no local analisado CRIS001 a tecnologia CRISPR/Cas9 – DBS alterou a região genómica sem inserção do HDR,

ou seja, nestes locais possivelmente ocorreram inserções ou deleções. Estas modificações podem alterar a região genómica que, por sua vez, anulam a expressão do gene. Além disso, alguns dos clones apresentam as bandas com a intensidade mais fraca. Uma das possíveis razões é a inserção do HDR só num dos alelos, ou seja, estes clones são possíveis clones heteroalelicos. Outra possível razão para obter a banda de 303 pb num possível clone será a mistura das células. O isolamento dos clones por anéis de vaselina pode apanhar células das colónias distintas, o que quer dizer que estes clones podem ter uma mistura de células com inserção do HDR com células não alteradas no mesmo local.

Como não se obteve nenhum clone homoalelico entre os clones isolados do primeiro grupo, foi feito uma análise a um segundo grupo de clones de RFA isolados pela Cláudia Florindo com o mesmo par de primers (RF1+RF2).

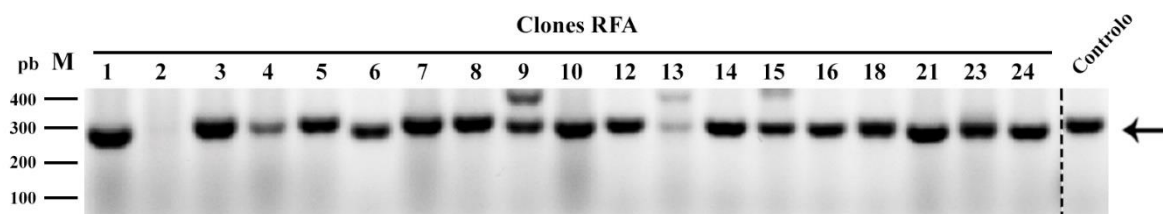


Figura 3.6. Eletroforese em gel de agarose dos produtos do PCR dos clones RFA com os primers RF1 e RF2 isolados pela Cláudia Florindo. No caso de haver inserção não aparece nenhuma banda, porque o tempo da extensão programado no termociclador não permite acabar a síntese do produto do PCR. Os números indicam os nomes dos clones. A seta indica o tamanho do fragmento normal, sem inserção do HDR. Controlo – DNA das células HeLa. M - Marcador GeneRuler 1Kb.

Dos clones analisados do segundo grupo (fig. 3.6) todos os poços dos clones com exceção do RFA 2 apresentam a banda nos 303 pb. No caso de ocorrer a inserção do plasmídeo na região CRIS001 o tamanho do fragmento ampliado por PCR ficara de 3 Kb e se não ocorrer a inserção o produto do fragmento é de 303 pb. O tempo da extensão no termociclador foi programado de maneira a não deixar a reação do PCR acabar a síntese dos fragmentos superiores a 1 Kb. Nos resultados obtidos (fig. 3.6) nos poços dos clones, onde não houve inserção nos dois cromossomas, apresentam a banda nos 303 pb. Nos poços dos clones que não apresentam a banda são possíveis clones nulos. Com a base desta informação pode-se afirmar que o único possível clone nulo é o RFA 2.

Para ter a certeza que no local CRIS001 por recombinação homologa inseriu-se o fragmento de HDR e não outra sequência qualquer, foram desenhados primers que hibridam na zona do HDR

(priSA3 e priSA4) (fig. 3.7 B). Foram realizadas as reações do PCR adicionais com os primers priSA3 (5'- GATGAAGGCTTTGCTGCCGTACATG) e priSA4 (5'- ACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAA) para confirmar a inserção de HDR no clone RFA 2.

Os verdadeiros clones nulos que têm a inserção do HDR no genoma devem ter três resultados confirmantes. O primeiro é a presença do produto do PCR de 989 pb que corresponde a distância entre os locais da hibridação dos primers RF1 e SA3 (fig. 3.7 – fragmento B). O segundo é a presença do produto do PCR de 816 pb que corresponde a distância entre os locais da hibridação dos primers SA4 e RF2 (fig. 3.7 – fragmento C). E o terceiro é a ausência do produto do PCR de 303 pb e a presença do produto do PCR nos 3.1 Kb que corresponde à distância entre locais da hibridação dos primers RF1 e RF2 (fig. 3.7 – fragmento A). Como tecnicamente é difícil ampliar os produtos do PCR superiores a 2 Kb o tempo da extensão no termociclador foi programado de maneira a sintetizar no máximo os produtos de 1.5 Kb.

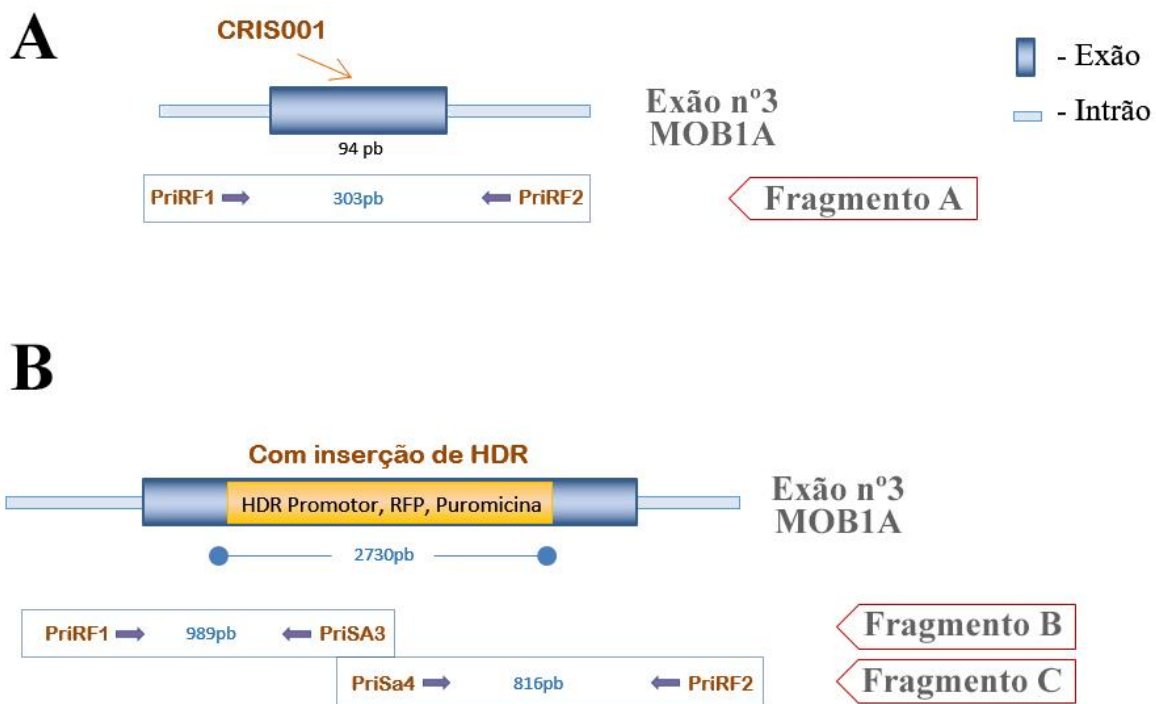


Figura 3.7. Representação esquemática do local no genoma do MOB1A onde o HDR se insere. O HDR é composto por zonas do loxP, o promotor, RFP (proteína vermelha fluorescente), e o gene que dá a resistência a puomicina. As setas roxas apresentam o sitio da hibridação dos primers. As grandes setas vermelhas do lado direito servem para facilitar a apresentação dos resultados dos PCR.

Os primers foram testados com sucesso no DNA das células HeLa para confirmar que não hibridam noutros locais da genoma. Quando o clone é nulo para MOB1A nos resultados do

PCR aparecem os fragmentos B e C, e o fragmento A não é detetado (fig. 3.7). Se clone for heteroalelico deverá aparecer os três fragmentos – A, B e C. Se no clone não houve recombinação homologa no local CRIS001 este só apresenta o fragmento A, e os fragmentos B e C não são detetados (fig. 3.7).

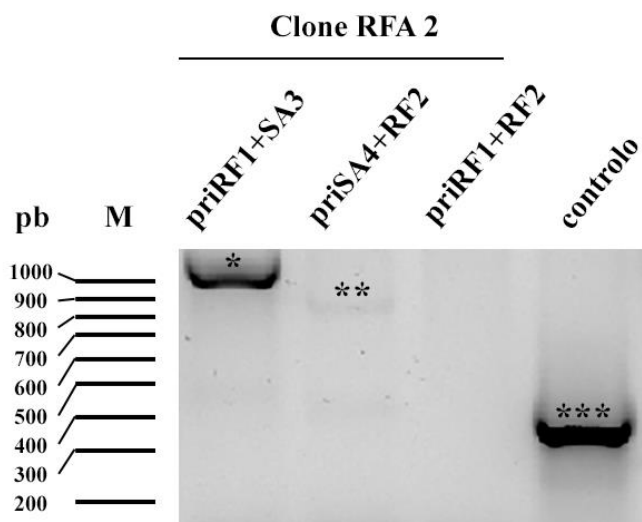


Figura 3.8. Eletroforese em gel de agarose do PCR do clone RFA 2. Os asteriscos correspondem aos fragmentos A, B e C da fig. 3.7. * - fragmento B. ** - fragmento C. *** - fragmento A. Controlo – DNA das células HeLa com os primers RF1 e RF2. M – marcador GeneRuler 1 kb.

O resultado obtido do PCR do clone RFA 2 (fig. 3.8) mostra que houve inserção do HDR com sucesso na região prevista (presença de fragmento B e C). A ausência de fragmento A ampliado indica que este clone é homoalelico para a inserção, ou seja, o possível clone nulo de MOB1A.

Em suma, de 39 linhas clonais analisadas do MOB1A foi encontrado 1 clone homoalelico para a inserção e nenhum heteroalelico. É importante notar que foi analisada só a primeira região do CRISPR, ou seja, é possível que dos clones analisados haja alguns clones homoalelicos e heteroalelicos para a inserção de MOB1A.

3.2.1. Determinação do local de inserção do HDR no MOB1A

As bandas do PCR que aparecem no gel de agarose ou acrilamida podem ter os tamanhos das bandas certas, mas não temos certeza se são as bandas devidas. Para tirar esta dúvida e para confirmar a inserção prevista foi tomada a decisão de sequenciar as bandas do PCR. Para tal, foi cortado o fragmento B obtida com par de primers RF1 e SA3 do clone RFA2 (fig. 3.8 - asterisco) do gel de agarose. O produto do PCR foi purificado, quantificado e enviado para sequenciação junto com os primers RF1 para MOB1A. A sequenciação da banda B confirmou a correta inserção do HDR no genoma do MOB1A no local previsto (fig. 3.9).

NTNNCTTGANTANNNCNNNTGTTTTCTCACTGGAGGTCTCATATTTGTGTTTACACAGACATTTTGACACAATT
 CTATTATCTCTGCAGCTGTGGATTCTTTAACCAGAGGTACCATCGAGCTAGCTGATTGTGCGAGTAGGACATAACT
TCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATCTGATCAGATCCTGCAGGTACTCGAGAAGGCGCGCCGTGGATCTGC
GGCCGGAAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAA
GTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACGGGTGCCTAGAGAAG

Figura 3.9. Resultado da sequenciação do produto do PCR do fragmento B do clone RFA2 obtido com os primers RF1 e SA3. Cinzento – região do intrão. Normal – região do exão. Sublinhado – sequência desconhecida. Negrito – sequência inserida HDR.

Entre a sequência genómica e a sequência de HDR (fig. 3.9) detetou-se uma sequência não identificada (fragmento sublinhado). A análise da sequência não identificada *in silico* nas bases de dados não permitiu identificar esta sequência.

3.3. Análise dos clones CRISPR do MOB1B

De modo a determinar que linhas clonais RFB tinham a inserção, obtidas pela aplicação da CRISPR, realizou-se uma abordagem por PCR. Foi escolhido o PCR, porque é um método que permite analisar a região genómica de interesse.

A sequência do HDR contém o gene que codifica para o RFP (proteína vermelha fluorescente) e a sequência que dá resistência a puromicina (droga usada para seleção dos clones com a inserção). Os gRNA (guide RNA), que guiam a maquinaria do CRISPR para o sitio escolhido não são igualmente eficientes em todos os locais do genoma. O mesmo gRNA desenhado para vários locais do genoma pode funcionar melhor num local do que no outro. Este facto pode ser explicado por heterogeneidade da cromatina e a variação da sua

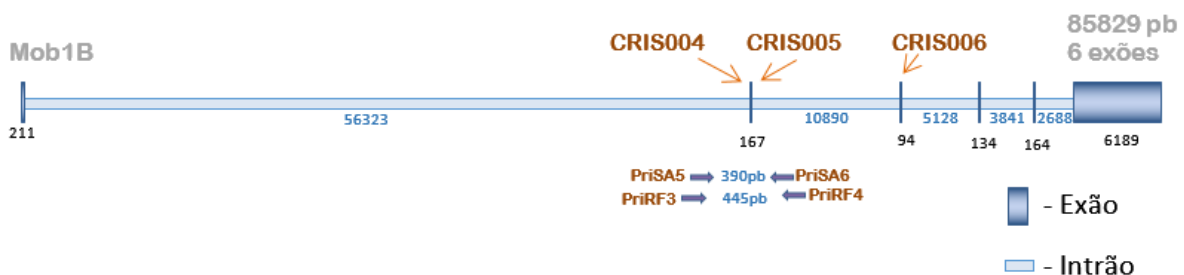


Figura 3.10. Representação gráfica dos locais da região genómica do MOB1B onde o CRISPR/Cas9 devia fazer os cortes de cadeia dupla e onde sequencialmente os plasmídeos do *knock-in* deviam inserir. Estas zonas foram denominadas CRIS. O primer PriSA5 é *forward* e o PriSA6 é *reverse*, e hibridam a volta da região onde o plasmídeo HDR deve inserir. As setas roxas representam a região onde os primers hibridam.

conformação. Por CRISPR, e segundo o método que utilizamos, pode haver três zonas de inserção do HDR. Consoante o comerciante (SCBT) as três regiões do CRISPR aumentam a eficácia da técnica aumentando a probabilidade de obter um clone nulo.

Nós só estávamos interessados em isolar linhas em que as alterações introduzidas na região genómica mais próxima do início do gene (CRIS004 e CRIS005 na fig. 3.10). A outra zona de alteração por CRISPR (CRIS006 na fig. 3.10) não nos interessava neste ponto do trabalho. Isto porque mesmo ocorrendo aí deleção/mutação do gene, a célula poderia produzir formas truncadas maiores da proteína MOB1B.

Por esta razão, os clones RFB foram analisados pelo PCR do genoma com os primers RF3 (5'-GGTCTAATGCTTGGTGAATGACTCTATTG) e priRF4 (5'-TGGGTGACTGAGTGAGACCCTGTCTC), desenhados para a região da alteração CRIS004 e CRIS005 (Fig. 3.10). O tamanho do fragmento ampliado com primers RF3 e RF4 nas células não alteradas é 445 pb. No caso de haver inserção do HDR o tamanho do fragmento passa ser 3.1 Kb. Analisaram-se 40 linhas clonais do RFB. De cada linha foi extraído, purificado e congelado o DNA genómico, para análise por PCR.

A análise inicial dos clones do Mob1B falhou (fig. 3.11). Após várias tentativas de otimização das condições nos poços dos PCR feitos com os primers RF3 e RF4 apareciam muitas bandas inespecíficas. Até no poço do controlo (fig. 3.11 – HeLa-RF3+RF4) houve muitas bandas inespecíficas, mas nas mesmas condições com outro par de primers (fig 3.11 – HeLa-RF1+RF2) obteve-se só uma única banda. A análise *in silico* usando ferramenta primerBLAST (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) mostrou que o par de primers RF3 e RF4 têm vários

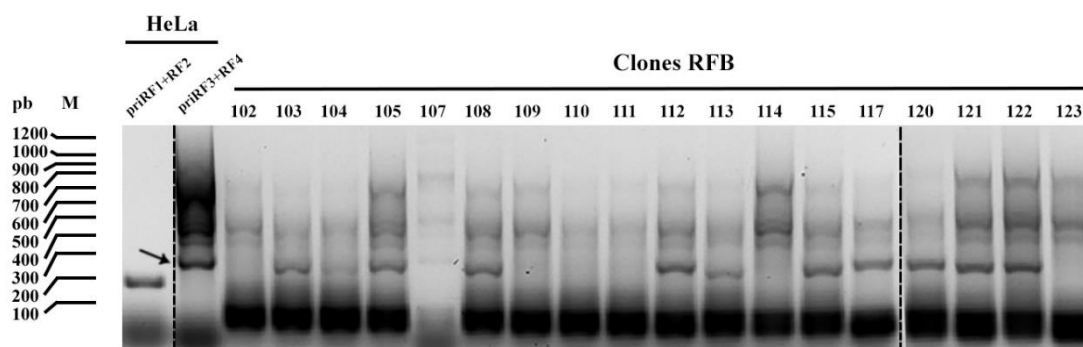


Figura 3.11. Eletroforese em gel de agarose dos produtos do PCR dos clones RFB selecionados por Ricardo Furtado. O resultado obtido com os primers RF3 e RF4. Os poços HeLa representam o DNA do genoma não alterado. A seta indica o tamanho do fragmento normal, sem inserção do HDR. O poço priRF1+RF2 serve para mostrar a diferença na qualidade do PCR entre os primers específicos e não específicos. Os números indicam os nomes dos clones. M - Marcador GeneRuler 1Kb.

sítios de hibridação na genoma. Com base nestes resultados duvidou-se nos primers e foram desenhados novos primers à volta das regiões CRIS004 e CRIS005 (fig. 3.10). O novo par de primers SA5 e SA6 têm o produto da ampliação de 390 bp.

Escolheram-se os possíveis clones nulos do PCR anterior (fig. 3.11) para analisar de novo com os primers SA5 e SA6. Assim foram escolhidos seis clones: 102, 107, 109, 110, 111, 114 que na análise anterior não apresentavam a banda nos 445 pb (o tamanho da banda sem inserção do HDR) (fig 3.11). A eletroforese dos produtos do PCR com os primers SA5 e SA6 permitiu detetar em todos os poços uma banda de tamanho previsto de 390 pb (fig 3.12).

De todos os clones só o RFB 111 não apresentou a banda nos 390 pb (fig. 3.12).

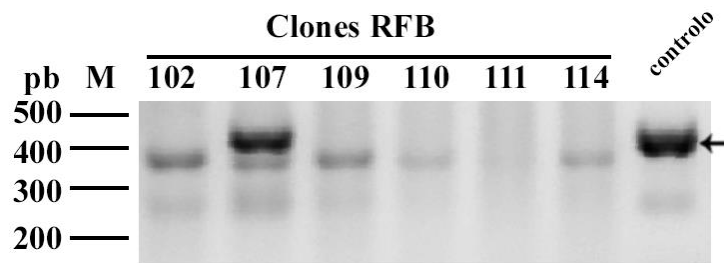


Figura 3.12. Eletroforese em gel de agarose dos produtos do PCR dos clones RFB (102, 107, 109, 110, 111, 114). O resultado obtido com os primers SA5 e SA6. Os números indicam os nomes dos clones. A seta indica o tamanho do fragmento onde não houve inserção do HDR. A seta indica o tamanho do fragmento normal, sem inserção do HDR. Controlo – DNA das células HeLa. M - Marcador GeneRuler 1Kb.

Como o tempo da extensão não era suficiente para sintetizar o fragmento de 3.1 Kb, a ausência da banda no poço do clone RFB 111 indica que este clone é o possível clone homoalelico para a inserção. O clone RFB 123 não foi reanalisado nesta experiência, mas foi analisado mais à frente nesta dissertação.

Antes de analisar o possível clone nulo com os primers SA3 e SA4 que hibridam no HDR, foi analisado um segundo grupo dos clones RFB, isolados por Cláudia Florindo. O segundo grupo foi analisado com mesmo protocolo usando os primers SA5 e SA6. Nesta análise notou-se que houve vários poços que não apresentavam a banda nos 390 pb (Fig. 3.13). Os clones dos quais não se obteve a banda nos 390 pb possivelmente têm a inserção do HDR.

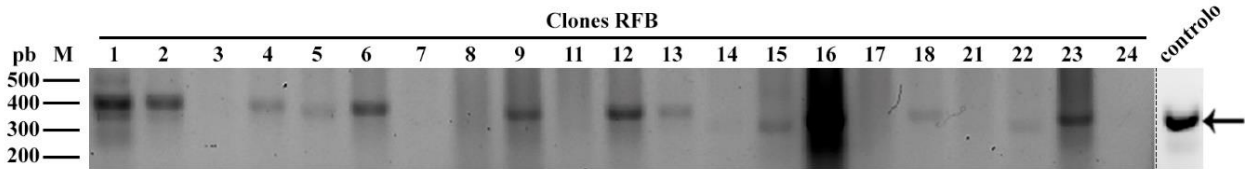


Figura 3.13. Eletroforese em gel de agarose dos produtos do PCR dos clones RFB dos clones isolados pela Cláudia Florindo. Resultado obtido com os primers SA5 e SA6. A seta indica o tamanho do fragmento normal, sem inserção do HDR. Os números indicam os nomes dos clones. Controle – DNA das células HeLa. M - Marcador GeneRuler 1Kb.

Para confirmar os resultados, foram feitas as reações com os primers (SA3 e SA4) que hibridam na sequência do HDR. Quando o clone é homoalelico para a inserção para MOB1B nos resultados do PCR aparecem os fragmentos E e F, o fragmento D não é detetado (fig. 3.14 B). Se o clone é heteroalelico aparecem os três fragmentos – D, E e F. Se o clone não sofreu com a recombinação homologa este só apresenta o fragmento D, e os fragmentos E e F não são detetados (Fig. 3.14 A).

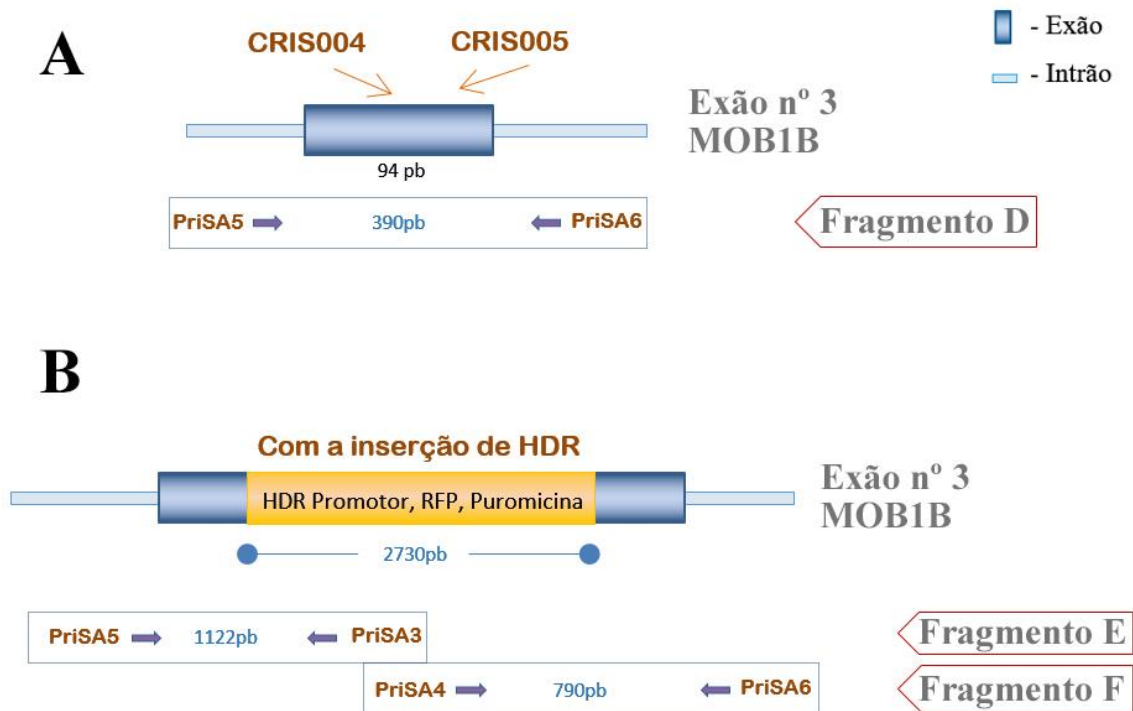


Figura 3.14. Representação esquemática do local no genoma do MOB1B onde o plasmídeo devia ter sido inserido. A sequência inserida é composta por zonas do loxP, o promotor, RFP (proteína vermelha fluorescente), e o gene que dá a resistência a puomicina. As setas roxas apresentam o sitio da hibridação dos primers. As grandes setas vermelhas do lado direito servem para facilitar a apresentação dos resultados dos PCR.

Dos dois grupos dos clones do RFB analisados foram escolhidos os clones 111, 123, 5, 7, 17, 18, 21 para análise com os primers SA3 e SA4 que hibridam na HDR no genoma do MOB1B.

Todos os clones analisados do RFB (fig. 3.15) apresentam as bandas com os primers SA3 e SA5 (fragmento E), SA4 e SA6 (fragmento F), SA5 e SA6 (fragmento D). Como apresentam as três bandas, significa que a inserção ocorreu num dos alelos. Com base desta informação os clones RFB 111, 5, 7, 18, 21 são heteroalelicos. Nos poços dos clones RFB 17 e 123 do PCR feitos com par de primers SA5 e SA6 (Fig. 3.15) aparecem varias bandas inespecíficas. Em qualquer caso estes clones foram considerados como heteroalelicos.

De 40 clones analisados do MOB1B os 7 clones (5, 7, 17, 18, 21, 111, 123) são heteroalelicos e nenhum é homoalelico para a inserção. Importante notar que foi analisada só a primeira e a segunda região do CRISPR, ou seja, é possível que dos clones analisados haja alguns nulos e heteroalelico de MOB1B. Aparentemente os dois locais próximos para CRISPR

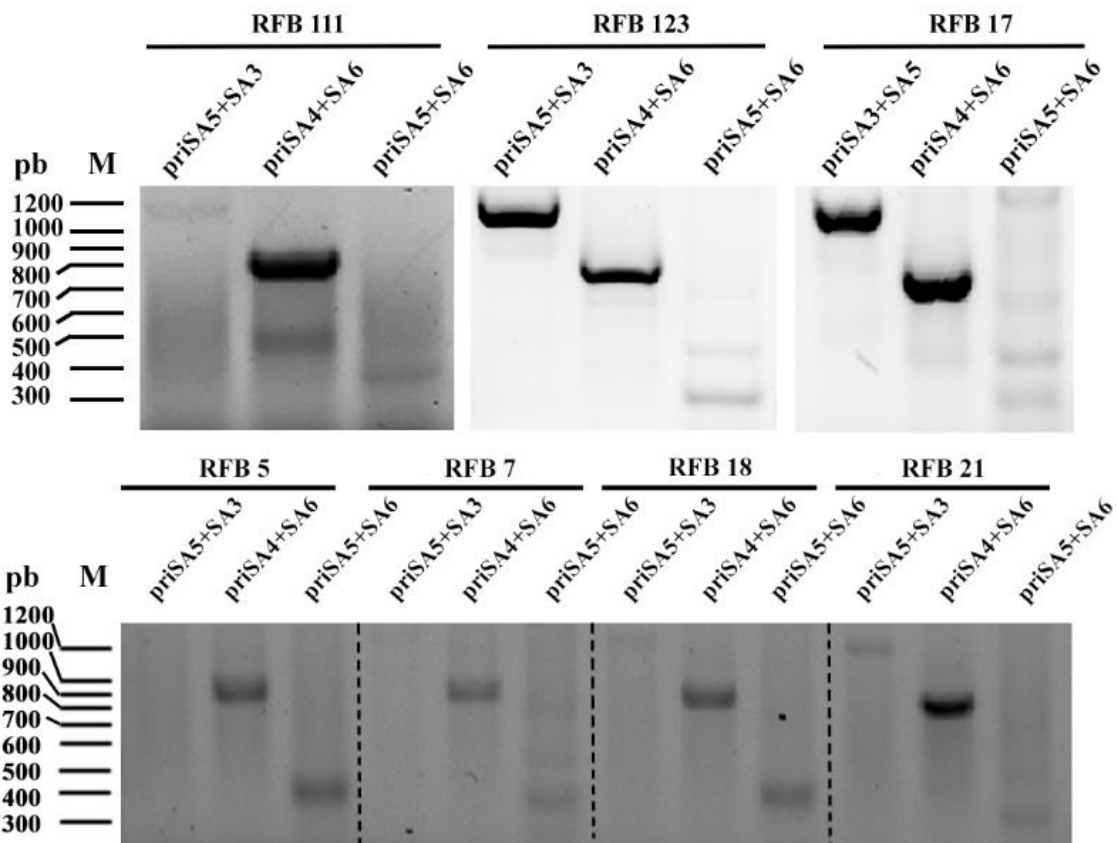


Figura 3.15. Eletroforeses em gel de agarose dos produtos do PCR dos clones RFB (5, 7, 17, 18, 21, 111, 123). As bandas correspondem as bandas previstas na figura 3.14. Nos clones RFB 111, 5, 7, 18, 21 os fragmentos E de 1200 pb nos poços priSA5+SA3 são presentes, mas são pouco visíveis. M - Marcador GeneRuler 1Kb.

aumentaram a eficácia da recombinação, mas mesmo assim, não conseguiu-se obter nenhum clone nulo de Mob1B.

3.3.1. Determinação do local de inserção do HDR no MOB1B

As bandas do PCR que aparecem no gel de agarose ou acrilamida podem ter os tamanhos das bandas certas, mas não temos certeza se são as bandas devidas. Para tirar esta dúvida e para confirmar o local de inserção foi tomada a decisão de sequenciar as bandas do PCR. Para tal, foi cortado o fragmento E obtido com par de primers SA5 e SA3 do clone RFB 123 (fig. 3.14) do gel de agarose. O produto do PCR foi purificado, quantificado e enviado para sequenciação junto com os primers SA5 para MOB1B. A sequenciação da banda E confirmou a correta inserção do HDR no genoma do MOB1B no local previsto.

```
CCNGNGGGGATTTTTANNC AANN TACAGTTTAGGTCTAATGCTTGGTGAATGACTCTATTGAATGTCATGCCTTAA  
ATATTA AACCTTTTTTTTTCTTTTCTATT CATAGTGGTAGTCGCTCTTCTAAA CTTTAAACCAAAGAAGAACATTC  
CAGAGGGTCTCACCAGTATGAGCTCTTAAAACACGCAGAAGCCACACTTGGCAGTGGCAACCTTCGGATGGCTG  
TCATGCTTGGTACCATCGAGCTAGCTGATTGTCGAGTAGGACATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT  
CTGATCAGATCCTGCAGGTA CTGAGAAGGCGCGCCGTGGATCTGCGGCCGGAAGGATCTGCGATCGCTCCG  
GTGCCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCCACAG
```

Figura 3.16. Resultado da sequenciação do produto do PCR do fragmento E do clone RFB 123 obtido com os primers SA5 e SA3. Cinzento – região do intrão. Normal – região da exão. Sublinhado – sequência desconhecida. Negrito – sequência inserida HDR.

Entre o exão onde houve o DBS e a sequência de HDR (fig. 3.16) detetou-se uma sequência não identificada (fragmento sublinhado). A análise da sequência não identificada *in silico* nas bases de dados não permitiu identificar esta sequência. É interessante que esta sequência desconhecida é igual à sequência desconhecida detetada pela sequenciação do clone RFA 2. Provavelmente, esta sequência pertence a plasmídeos onde os HDRs estão incorporados para servir como o modelo quando ocorre a recombinação homóloga.

3.4. Confirmação dos gRNA por sequenciação

3.4.1. Sequenciação dos gRNA

Como foi explicado anteriormente, a criação dos clones nulos foi feita com a tecnologia CRISPR e para tal foi adquirido o kit da SantaCruz Biotek com os plasmídeos de Cas9 e gRNA

mais os plasmídeos do HDR. Para confirmar os gRNA que vinham no kit, ou seja, para confirmar se a Cas9 corta no sitio previsto foi tomada a decisão de sequenciar os gRNA. O kit traz os três tipos de plasmídeos da Cas9 misturadas por gene. Antes de enviar os plasmídeos para sequenciação foi aumentado o stock destas nas bactérias *E. Coli*. As bactérias conseguem absorver só um plasmídeo durante a transformação. A individualização das colônias após a transfecção permitiu separar os plasmídeos de gRNA. A sequenciação permitiu descobrir que gRNA está em cada colónia.

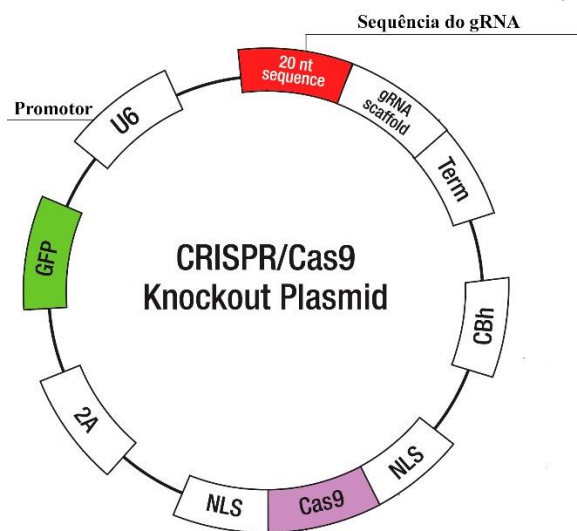


Figura 3.17. A esquema do plasmídeo do CRISPR da SCBT. Vermelho – posição da sequência que codifica para gRNA.

Quando planeou-se a experiência do CRISPR o vendedor SantaCruz Biotek usava o promotor EF1A para expressar os gRNA. Para este promotor foi desenhado e adquirido o primer RF7 (5'-CGTGTTCTCTCTAGTTTGGTATAGAAGC) para fazer a sequenciação. Quando chegou o kit do CRISPR foi notado que a SantaCruz Biotek alterou o promotor para U6 humano. Por esta razão foi desenhado e adquirido outro primer U6 (5'-ACTATCATATGCTTACCGTAAC) para fazer a sequenciação. A sequenciação por método de Sanger foi feita no departamento da Biologia Marinha na Universidade do Algarve.

A sequenciação confirmou que os gRNA estão corretos. Agora temos os plasmídeos individualizados contendo os gRNA para MOB1A e MOB1B. Os tubos foram nomeados consoante a região onde ocorre o CRISPR, por exemplo CRIS001 ou CRIS005. Esta separação permite aplicação dos gRNA individualmente na criação dos clones nulos.

3.5. Alteração do nível proteico do MOB1

O objetivo final de realizar a deleção do gene é abolir a produção proteica deste gene. Como o MOB1A tem uma grande homologia com o MOB1B era interessante ver se a deleção de um deles vai ser recompensada por outro, ou seja, se a perda da função do MOB1A vai ser substituída ou complementada por MOB1B e vice versa. O problema enfrentado era os anticorpos incapazes de distinguir os MOB1 um de outro. Por esta causa foi analisada só a quantidade total do MOB1 nos clones nulos e heteroalelicos em comparação com o controlo (células HeLa).

No nosso caso só tivemos um clone nulo – RFA 2 (MOB1A) e vários clones heteroalelicos do RFB (MOB1B). Dos clones do Mob1B foram escolhidos os clones 17 e 123 para a análise. Dos resultados esperados no clone nulo do MOB1A (RFA 2) no caso de haver uma substituição do MOB1A por MOB1B a quantidade da proteína MOB1 não devia ter grande diminuição, e no caso não ter a recompensação esperou-se ter maior diminuição na quantidade final do MOB1.

A variação do nível proteico foi medida por Western-Blot com os anticorpos primários que reconhecem o MOB1 (MOB1A e MOB1B). O MOB1A e MOB1B têm peso molecular de 25kDa.



Figura 3.18. O Western-Blot do clone nulo do RFA 2 (MOB1A) e dos clones heteroalelicos RFB 123 e RFB 17 (MOB1B). Controlo – o Western-Blot feito a partir do estrato proteico das células HeLa não alteradas.

Os resultados obtidos por Western-Blot (fig. 3.17) mostram que houve uma grande redução da intensidade da banda correspondente a Mob1 no clone nulo de MOB1A (RFA 2), ou seja, a quantidade da proteína MOB1 é menor em comparação com o controlo. No clone heteroalelico RFB 123 (MOB1B) a intensidade da banda é igual a do controlo, em quanto a banda do clone RFB 17 é mais forte. Isto sugere que num dos clones não houve alteração da quantidade do MOB1 e no outro a quantidade do MOB1 aumentou sucessivamente. Na preparação das

amostras foi contado mesmo número de células para cada clone e controlo. Mesmo assim, para confirmar esta hipótese eu devia fazer o controlo de carregamento da mesma membrana PVDF incubando com o anticorpo primário contra outra proteína qualquer. Se a intensidade das bandas do controlo tivesse mesma intensidade em todas as linhas de corrida, assim confirmava o resultado obtido.

Na descrição do comerciante é dito que anticorpo primário usado era feito contra MOB1A, ou seja, pode ter a maior afinidade para MOB1A do que para MOB1B. Como uma hipótese, esta informação sugere que possivelmente no clone RFB 17 há uma substituição de falta do MOB1B por MOB1A, enquanto no RFB 123 não há esta substituição. Assim possivelmente no clone RFA 2 a substituição da função por MOB1B não é detetada por causa da afinidade do anticorpo. Uma outra hipótese para interpretar estes resultados é uma possível abundância intracelular distinta entre MOB1A e do MOB1B, ou seja, um pode ser mais abundante que o outro. Se nas células não alteradas o MOB1A é predominante isto explica o fato da diminuição do nível proteico tão grande no clone RFA 2, e mesmo havendo uma substituição da função por MOB1B. Para testar esta hipótese, era preciso repetir a experiência com um clone nulo de MOB1B. Desta maneira, a observação da redução do nível proteico do clone nulo MOB1B justificava os resultados obtidos.

No entanto, foram analisados poucos clones do MOB1A e do MOB1B. Esta experiência deve ser repetida com o maior número de clones homoalelicos e heteroalelicos para inserção de forma a analisar o maior número de amostras.

3.6. Imunofluorescência dos clones CRISPR

A imunofluorescência é uma técnica que permite a visualização de antígenos nos tecidos ou em suspensões celulares utilizando corantes fluorescentes. Há dois métodos mais utilizados para fazer a imunofluorescência. O primeiro método é chamado direto (fig. 3.19) e consiste no uso direto de anticorpos primários conjugados com os corantes específicos contra o alvo. O segundo é o método chamado indireto ou de “sandwich” (fig. 3.19) onde no início ocorre a incubação com o anticorpo primário que é específico contra o alvo e, a seguir, incuba-se com o anticorpo secundário conjugado com corante que é específico contra o animal onde o anticorpo primário foi produzido.

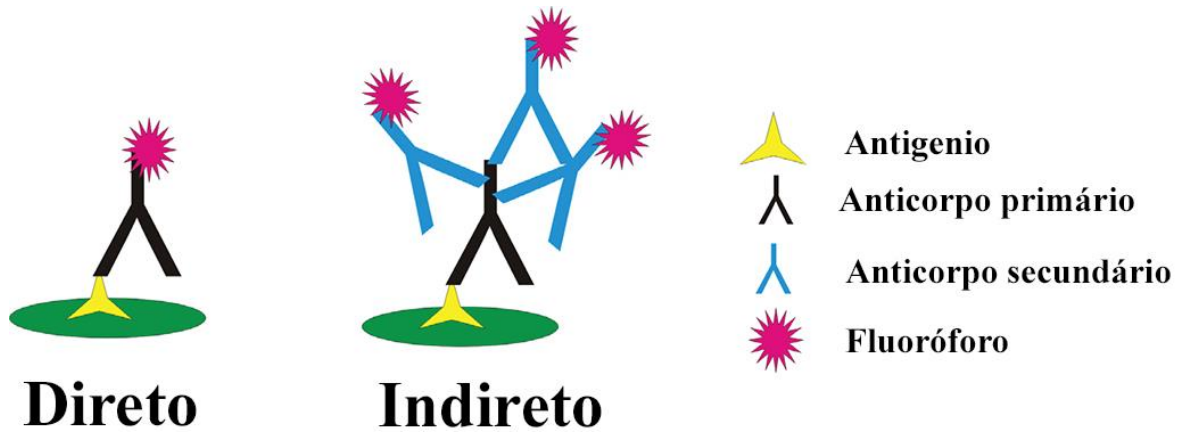


Figura 3.19. Diferença entre marcação direta e indireta.

O clone nulo do MOB1A (RFA 2) e heteroalelico do MOB1B (RFB 123) foram descongelados e colocados a crescer. Durante o crescimento das células foram anotadas algumas alterações

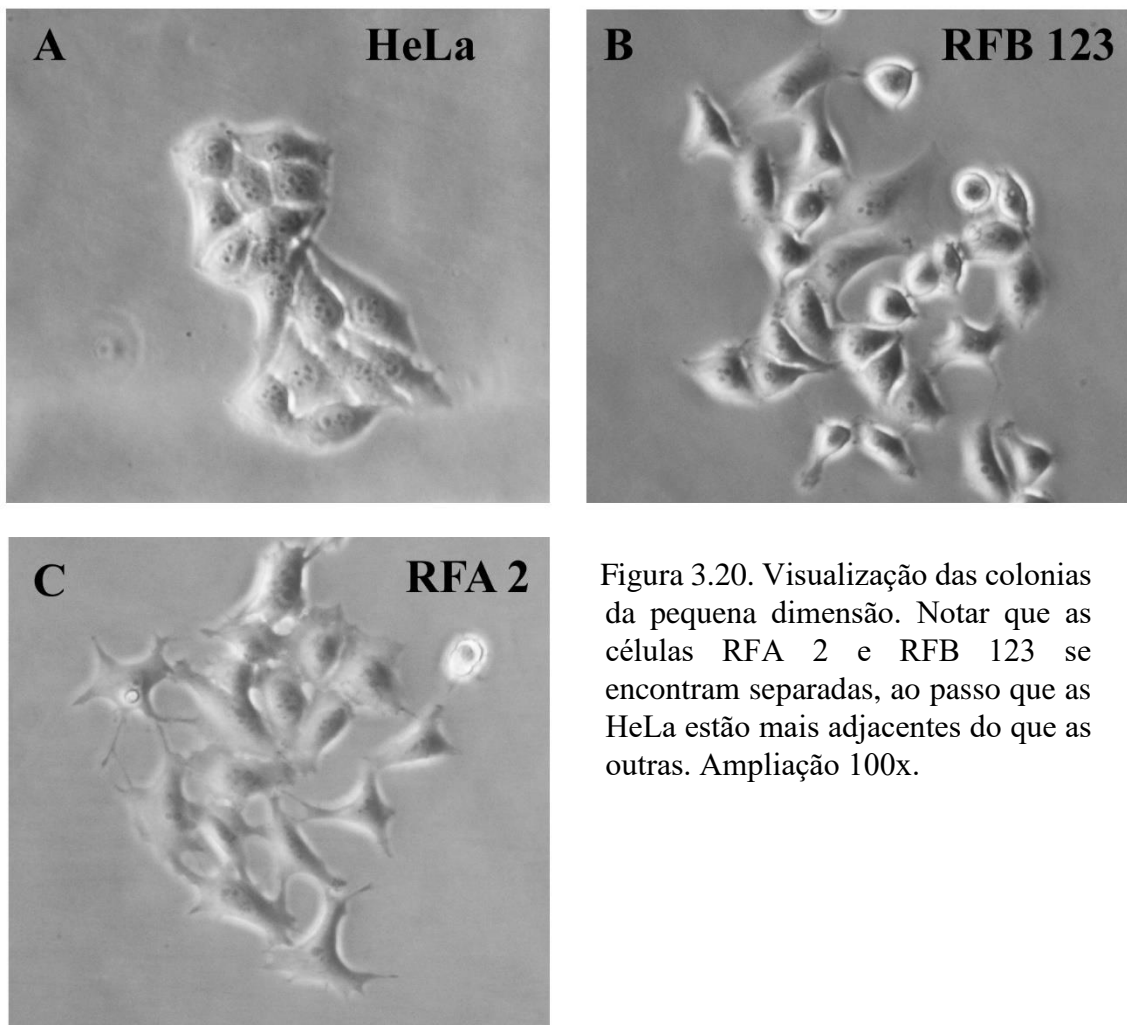


Figura 3.20. Visualização das colônias da pequena dimensão. Notar que as células RFA 2 e RFB 123 se encontram separadas, ao passo que as HeLa estão mais adjacentes do que as outras. Ampliação 100x.

morfológicas no clone nulo RFA 2 e clones heteroalelico RFB 123 (fig. 3.20). Quando há espaço livre a volta das células como no clone nulo de MOB1A (fig. 3.20 C) tal como no clone heteroalelico de MOB1B (fig. 3.20 B) as células começam a espalhar para os lados afastando uma de outra. Quando aumenta a confluência diminui o espalhamento das células nos dois clones RFA 2 e RFB 123.

Para descrever o fenótipo do clone nulo RFA 2 e heteroalelico RFB 123 foi realizada a imunofluorescência. Foram marcados os microtúbulos e o DNA para ver se houve alterações/defeitos durante as mitoses comparando com as células HeLa originais.

Na base de dados *Human Protein Atlas* (www.proteinatlas.org, Agosto 2017) nos cancros em humanos há uma diminuição da expressão da proteína de MOB1A e do MOB1B. Para ver se a deleção total do MOB1A ou parcial do MOB1B afeta o ciclo celular foram calculados o índice mitótico e a taxa da proliferação.

Para analisar a taxa de proliferação foram seguidas as colônias de células de tamanhos pequenos (até 10 células no primeiro dia) em três passagens diferentes. Foram tiradas fotografias e contadas as células diariamente durante 4 dias após a passagem. Foi feita a media da curva de

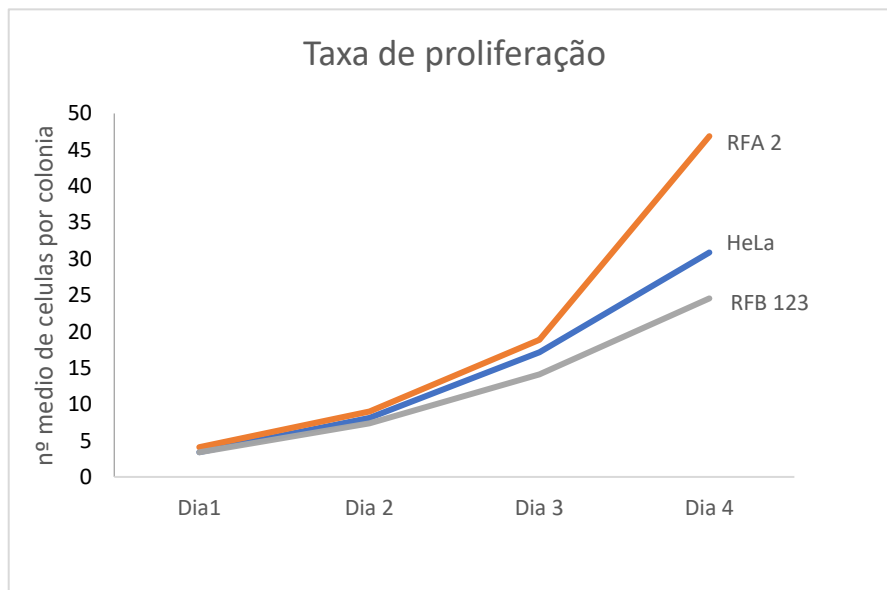


Figura 3.21. Alterações dos clones RFA2 e RFB 123. A comparação da media de taxa de proliferação dos clones selecionados de MOB1A (RFA 2, linha de cor-de-laranja) e do MOB1B (RFB 123, linha cinzenta) com as células não alteradas (HeLa, linha azul). Nota-se um aumento da taxa de proliferação no clone homoalelico para inserção RFA 2 comparando com as células HeLa. No clone heteroalelico RFB 123 há uma diminuição da taxa de proliferação comparando com as células HeLa. Para clone RFB 17 não foi calculada a taxa de proliferação.

crescimento para cada clone. A taxa de proliferação do clone nulo de MOB1A (RFA 2) (fig. 3.21 – linha cor-de-laranja) aumentou e no clone heteroalelico do MOB1B (RFB 123) (fig. 3.21 – linha cinzenta) diminuiu em comparação com as células controlo (HeLa) (fig. 3.21 – linha azul). Por outro lado, o índice mitótico (fig. 3.22) não varia muito entre os clones RFA 2, RFB 123, RFB 17 e o controlo (HeLa). Esta informação sugere que a divisão celular é mais rápida no clone nulo do MOB1A (RFA 2) sem o aumento do índice mitótico. Uma hipótese possível é que as fases G1, S e G2 ocorram mais rápido no clone RFA 2. Outra hipótese é que no clone RFB 123 ocorre um bloqueio nas fases G1, S e G2. Para confirmar que estes fenótipos não são os efeitos do *offtarget* é necessário analisar mais clones nulos de MOB1A e MOB1B.

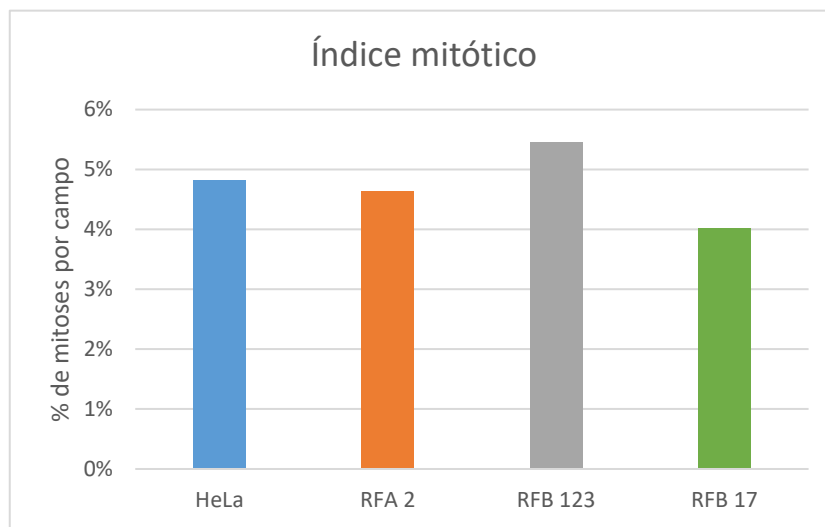


Figura 3.22. Alterações dos clones RFA2, RFB 123 e RFB 17. A comparação do índice mitótico dos clones MOB1A (RFA 2, barra de cor-de-laranja) e MOB1B (RFB 123 e RFB17, barra cinzenta e verde) com as células não alteradas (HeLa, barra azul). O índice mitótico não varia muito nos clones em comparação com as células não alteradas.

Observei que com a deleção do gene do MOB1A no clone RFA 2 aumentou a quantidade de células multinucleadas detetadas (fig. 3.23 – barra cor-de-laranja) em 5 vezes em comparação com o controlo (células HeLa originais). Com deleção parcial do gene Mob1B nos clones RFB 123 (fig. 3.23 – barra cinzenta) e RFB 17 (fig. 3.23 – barra verde) aumentou a quantidade de células multinucleadas em media 4 vezes em comparação com o controlo. Aumento de células multinucleadas sugere que aumenta a falha de citocineses durante a proliferação celular nos clones RFA 2, RFB 123 e RFB 17.

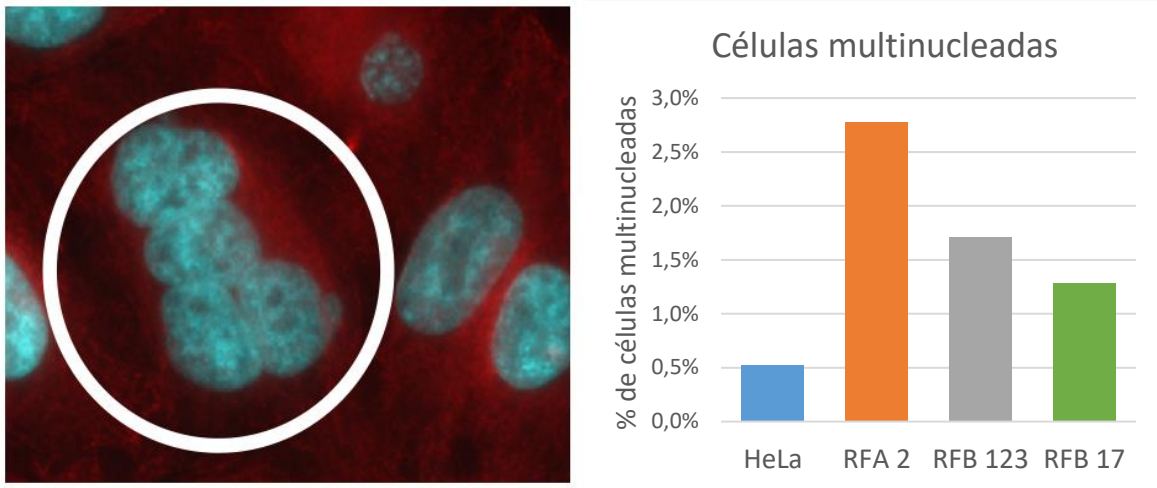


Figura 3.23. Alterações dos clones RFA2, RFB 123 e RFB 17. A deleção de MOB1A ou de MOB1B aumenta o número das células multinucleadas em comparação com as células não alteradas. No clone homoalelico para a inserção o número das células multinucleadas aumenta em cinco vezes e nos clones heteroalelicos em três vezes. Fotografia tirada das células do clone RFA2. Circulo branco cobre a célula multinucleada. Microtúbulos marcados a vermelho. O DNA marcado azul (DAPI). Ampliação 400x.

Em células sem MOB1A como sem MOB1B aumentou a quantidade de células com micronúcleos (fig. 3.24). Este aumento de células com micronúcleos foi de 5 vezes no clone nulo de MOB1A (RFA 2) (fig. 3.24 – barra cor-de-laranja) em comparação com o controlo (células HeLa) (fig. 3.24 – barra azul). Nos clones heteroalelicos de Mob1B (RFB 123 e RFB

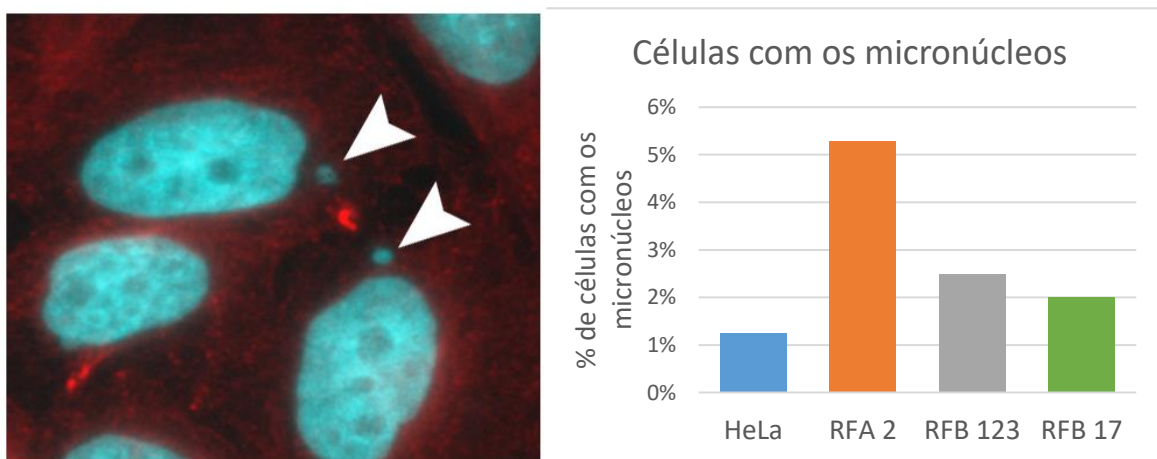


Figura 3.24. Alterações dos clones RFA2, RFB 123 e RFB 17. A deleção de MOB1A ou de MOB1B aumenta o número das células com os micronúcleos em comparação com as células não alteradas. A fotografia tirada do clone RFB 123. Microtúbulos marcados a vermelho. O DNA marcado azul (DAPI). As pontas das setas apontam para os dois micronúcleos de duas células adjacentes. Ampliação 400x.

17) (fig. 3.24 – barra cinzenta e verde) foi de 2 vezes em comparação com o controlo (células HeLa) (fig. 3.24 – barra azul). O aparecimento de micronúcleos indica que podem ocorrer erros na separação dos cromossomas durante a Anáfase ou numa falha do checkpoint que inibe o início da anafase antes de alinhamento completo dos cromossomas ou a falha dos dois ao mesmo tempo.

A imunofluorescência realizada no clone nulo e heteroalelico permitiu caracterizar um fenótipo exclusivo que não foi detetado nos trabalhos anteriores feitos com siRNA contra MOB1A e MOB1B [43]. Este fenótipo são as pontas de ligação de DNA entre as células, chamadas de pontes de cromatina (fig. 3.25). No clone nulo de MOB1A (RFA 2) (fig. 3.25 – barra cor-de-laranja) houve um aumento de 4 vezes das pontes de cromatina em comparação com as células de controlo (células HeLa) (fig. 3.25 – barra azul). Nos clones heteroalelicos de MOB1B (RFB123 e RFB 17) (fig. 3.25 – barra cinzenta e verde) houve um aumento de 2 vezes das pontes de cromatina em comparação com as células de controlo (células HeLa).

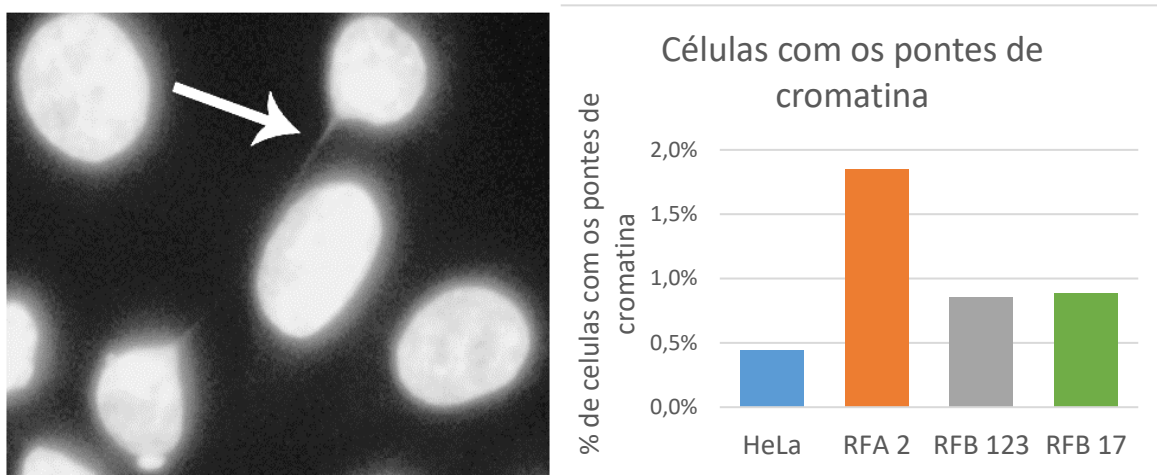


Figura 3.25. Alterações dos clones RFA2, RFB123 e RFB17. A deleção de MOB1A ou de MOB1B aumenta o número das células com as pontes de cromatina entre as células. A fotografia tirada do clone RFB 123. DNA marcado azul (DAPI). A seta aponta para a ponte de cromatina. Ampliação 400x.

Um ultimo fenótipo interessante observado é a observação de células gigantes (fig 3.26 – asterisco). Este fenótipo é muito raro, em media 2-3 células por placa de cultura de células de 60mm, mas que nunca aparece no controlo. Neste caso, as células gigantes aparecem tanto no clone nulo de MOB1A como nos clones heteroalelicos de MOB1B. O tamanho gigante das células sugere varias falhas do fuso mitótico e avanço no ciclo celular mesmo sem ocorrência de mitose e citocinese. Para ter este tamanho as células deviam ter falhado vários vezes na

mitose e citocinese, porque o tamanho da célula depende da quantidade do material genético nela [56].

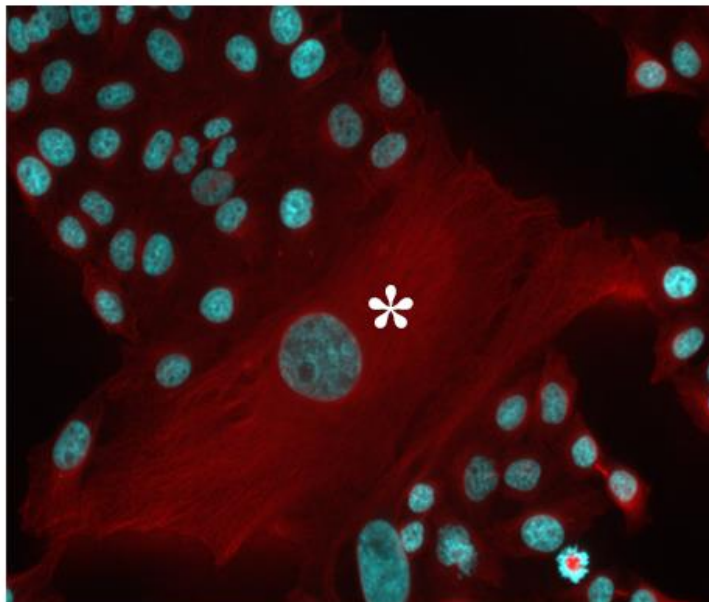


Figura 3.26. A deleção do MOB1A ou de MOB1B leva ao aparecimento das células gigantes. Estrela marca célula gigante. Microtúbulos marcados a vermelho. O DNA marcado azul (DAPI). Ampliação 400x.

3.7. Aplicação da tecnologia CRISPR na deleção dos genes MOB1A e MOB1B na linha RPE-I

Para confirmar que os fenótipos observados não são específicos da linha celular HeLa é necessário repetir o protocolo noutra linha celular. Foi escolhida a linha hTERT-RPE-I por duas razões. A primeira razão é que esta linha é primária, ou seja, é mais parecida com as células no corpo humano. A segunda razão é que esta linha já foi usada previamente no nosso laboratório para estudar o fenótipo das células com siRNA contra MOB1A e MOB1B [43].

Antes de aplicar o CRISPR é necessário estabelecer a concentração de droga mínima necessária para matar as células, de modo a permitir a identificação e reparação das células em que ocorreu a inserção do HDR. No nosso caso a droga é a puromicina. Durante a pesquisa da informação sobre a linha celular RPE-I foi encontrado o artigo [56] onde os autores indicam que a linha RPE-I usada tem a resistência a puromicina e higromicina. Como no nosso caso, a seleção dos clones nulos é feita com aplicação da puromicina era necessário testar se as nossas

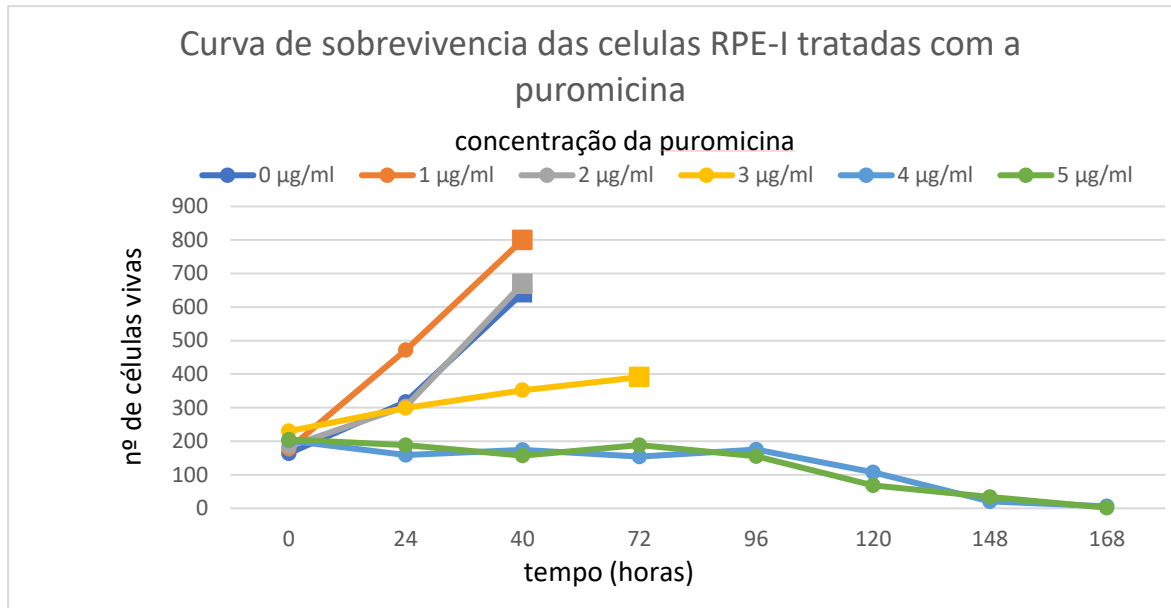


Figura 3.27. Curva de sobrevivência das células RPE-I tratadas com a puromicina. Quadrado indica que as células chegaram a confluência.

células de RPE-I iriam morrer após tratamento com a puromicina e determinar a concentração mínima necessária para matar as células.

Da experiência realizada foram tiradas varias fotografias das células RPE-I. As nossas células são sensíveis a puromicina a concentração de 3 µg/ml (fig. 3.27 – linha amarela). A concentração mínima necessária para matar as células RPE-I é de 5 µg/ml (fig. 3.27 – azul).

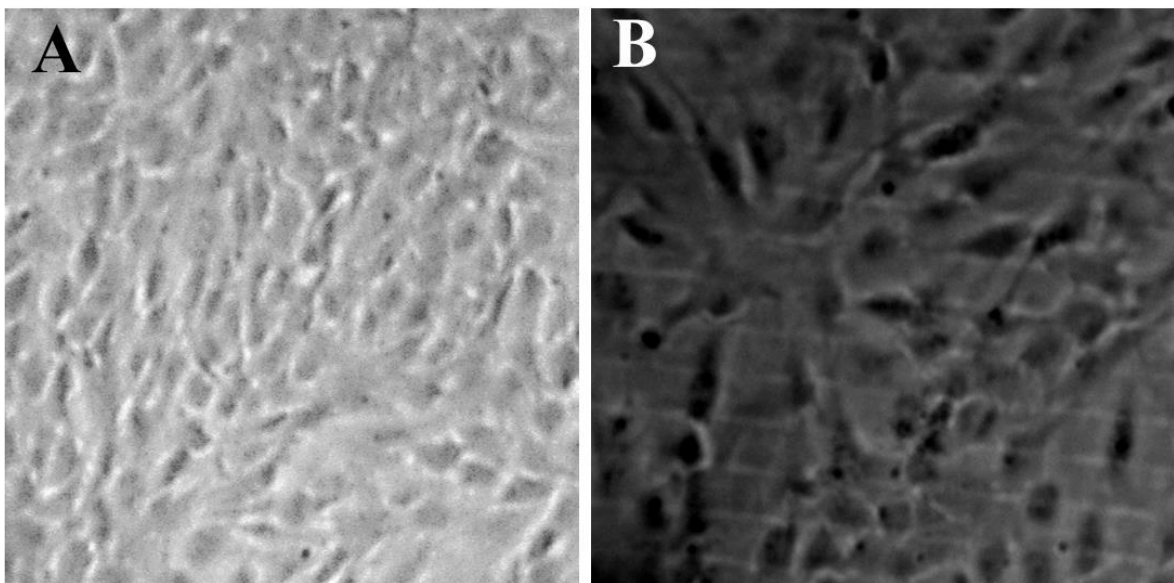


Figura 3.28. As dozes pequenas de puromicina influenciam o tamanho das células RPE-I. **A** – células sem aplicação da puromicina. **B** – células com 3 µg/ml da puromicina. Ampliação 100x.

Nas concentrações baixas de puromicina as células aumentam o seu tamanho. Por esta causa na concentração de 3 µg/ml as celas chegam a confluência com poucas células (fig. 3.28). Então, a concentração da puromicina a usar futuramente seria de 5 ug/ml nas células RPE-I.

3.8. Resultados obtidos do ASPM

Um projeto paralelo que ao dos MOB1s foi tentar criar clones nulos ASPM em células HeLa. A criação dos clones nulos com a tecnologia CRISPR precisa de um método eficaz de isolamento e seleção dos clones nulos. No nosso caso pretende-se isolar os clones usando FACS e selecionar por Western-blot.

Os nossos objetivos eram caracterizar os fenótipos dos alelos nulos em comparação com os alelos anteriores que são formas truncadas. Pretendeu-se caracterizar os fenótipos associados durante mitose e citocinese no cérebro em desenvolvimento. O modelo animal foi a mosca de *Drosophila*, mais precisamente a larva no estágio três de desenvolvimento. A maior parte dos órgãos nas larvas aumentam só o tamanho a partir do crescimento de células sem ocorrer as divisões celulares. Apenas no cérebro ocorrem divisões celulares sucessivas que levam ao aumento do número de células e o tamanho do cérebro.

No nosso laboratório já tínhamos dois alelos nulos de *Drosophila* para ASP. Os alelos nulos foram criados pela excisão imprecisa do elemento P. Obtivemos dois alelos mutantes do

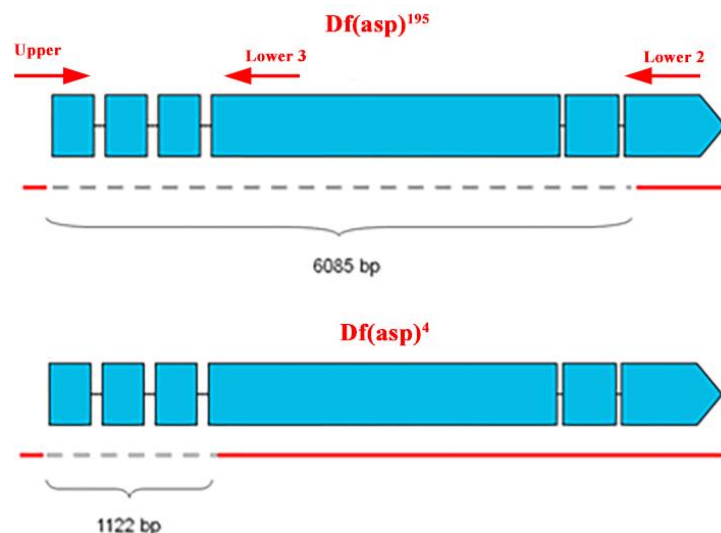


Figura 3.29. A representação esquemática do genoma da *Drosophila* do gene ASP. Tracejado cinzento mostra o fragmento deletado. O ASP⁴ tem a deleção de 1122 pb e o ASP¹⁹⁵ tem a deleção de 6085 bp. Setas vermelhas representam o local da hibridação e orientação dos primers Upper, Lower 2 e Lower 3.

ASP – ASP⁴ e ASP¹⁹⁵ (fig. 3.29). Para excluir efeitos noutros locais da genoma os alelos 4 e 195 foram cruzados para ter um mutante heteroalelico ASP^{4/195}.

Durante as primeiras análises do fenótipo da microcefalia nos alelos mutantes a aluna que estava a realizar o estágio no nosso laboratório, notou que as moscas selvagens têm o tamanho do cérebro igual dos alelos mutantes, que eram esperados de ter cérebro menor. Uma hipótese possível era a variação da temperatura da câmara onde os stocks de moscas foram mantidos. Para testar esta hipótese, o stock de moscas com a deleção do ASP4/195 foi transferido durante um mês para câmaras a 18°C e 25°C. Passado um mês, foi comparado o tamanho de cérebros entre moscas mutantes e moscas selvagens. Para tal dissecaram-se as larvas no estágio três de desenvolvimento (fig. 3.30). Os resultados obtidos mostram que os cérebros das moscas mutantes crescidas a 25°C são mais pequenos (fig. 3.30 A) em comparação com os cérebros das moscas selvagens (fig. 3.30 B). Significa que o fenótipo da microcefalia aparece nos stocks dos mutantes a 25°C, e aos 18°C os mutantes têm tamanho do cérebro igual aos selvagens.

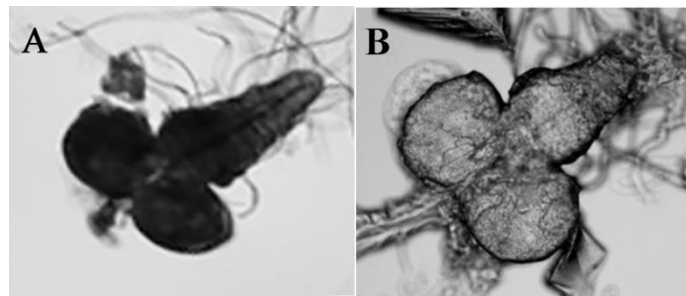


Figura 3.30. As deleções no gene ASP causam a microcefalia nas moscas. **A** – cérebro da *Drosophila* do mutante ASP^{4/195}. **B** – cérebro da *Drosophila* selvagem. Ampliação 50X.

Uma outra hipótese era contaminação do stock. Decidiu-se assim confirmar que os stock mutantes não tinham perdido as mutações. Para tal realizou-se uma abordagem por PCR. Extraíu-se o DNA de moscas adultas mutantes e moscas selvagens e realizou-se o PCR com par de primers Up+Low2 (produto 6.5 Kb) e Up+Low3 (produto 1.75 Kb) (fig. 3.29). Estes fragmentos do PCR têm um tamanho muito grande para conseguir amplificar nas moscas selvagens. Por esta razão, como controlo da deleção foram usadas as moscas mutantes ASP⁴ e ASP¹⁹⁵. Nos mutantes o produto do PCR com primers Up+Low2 é de 400 pb e com Up+Low3 o produto é de 600 pb. Dos resultados obtidos do PCR os dois mutantes ASP⁴ e ASP¹⁹⁵ apresentam os fragmentos de 600 e 400 pb respetivamente, que confirma a deleção prevista (fig. 3.31). Assim, os resultados do PCR confirmam o bom estado do stock dos mutantes a partir

dos quais foi feito o mutante duplo $ASP^{4/195}$. Por outro lado, o mutante duplo $ASP^{4/195}$ apresentou o fragmento obtido com primers Up+Low3 de 600 pb que corresponde a deleção do mutante ASP^4 . O fragmento previsto de 400 pb com primers Up+Low2 não foi detetado. Nas outras tentativas de obter o fragmento de 400 pb com os primers Up+Low2 no mutante duplo sempre falhavam. Assim concluiu-se que durante as passagens de moscas o stock do mutante duplo perdeu a deleção ASP^{195} , ou seja, estas moscas ficaram apenas com a deleção ASP^4 .

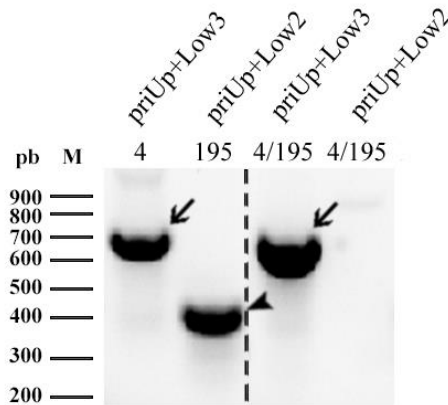


Figura 3.31. Confirmação da deleção do ASP nos mutantes de *Drosophila*. Seta aponta para o fragmento previsto para deleção no mutante ASP^4 . Ponta da seta aponta para o fragmento previsto para deleção no mutante ASP^{195} . M - Marcador GeneRuler 1Kb.

4. Discussão

Os genes MOB1 são essenciais para a sobrevivência de um organismo começando de levedura até aos humanos [86],[87],[91],[92]. Em humanos há dois genes MOB1 muito semelhantes: MOB1A e MOB1B. O nosso grupo demonstrou que em linhas celulares de humanos a falta de ambos MOB1A/B causa a falha na coesão dos centríolos, falha na abscisão e aumento motilidade das células [82]. O próximo passo era estudar a função de MOB1A e de MOB1B separadamente em células humanas. Para isto, foi feita a deleção dos genes MOB1A e MOB1B usando a técnica CRISPR/Cas9.

A técnica CRISPR entre muitas funções pode ser usada para criar deleção de qualquer gene de interesse. No nosso caso, foi analisada a deleção do gene a partir da inserção da sequência de interesse por método de HDR dentro do genoma no local previsto. A inserção da sequência faz interrupção durante a transcrição do gene afetado, desta maneira impedindo a função correta do gene. Neste caso concreto, tivemos três locais para MOB1A e três locais para MOB1B no genoma. Neste estudo só analisamos o primeiro local mais próximo do início do gene de MOB1A e de MOB1B.

O HDR ocorre em 2% dos casos quando há um corte de cadeia dupla no DNA, mas por outro lado este método facilita a seleção dos clones, porque dá às células resistência contra puromicina. Teoricamente todos os clones tratados com a puromicina que sobrevivem na placa da cultura das células são pelo menos heteroalelicos. Outro mecanismo da reparação NHEJ ocorre com a maior frequência e cria vários defeitos na genoma como mutações, deleções ou inserções. Por outro lado, a seleção é mais difícil e necessita o FACS e os anticorpos monoclonais para separar as células transfetadas e para fazer rastreio das colônias. No nosso caso, o método da seleção por FACS e anticorpos não ia funcionar devido ao grande homologia de 95% entre MOB1A e Mob1B não há nenhum anticorpo que consegue distinguir estes genes. Este método podia ser utilizado mais à frente na criação dos clones nulos duplos de MOB1A e Mob1B.

O primeiro objetivo que tive era a identificação e seleção dos clones nulos para os genes MOB1A e MOB1B. O segundo objetivo era a caracterização dos fenótipos obtidos dos clones nulos de MOB1A e de MOB1B. Neste trabalho, consegui identificar um clone nulo de MOB1A, clone RFA 2 (homoalelico para inserção), e nenhum clone heteroalelico para inserção. Para os clones do MOB1B, não identifiquei clone nulo, mas identifiquei sete clones heteroalelicos para inserção: RFB 5, RFB 7, RFB 17, RFB 18, RFB 21, RFB 111, RFB 123. A

reparação do DSBs por recombinação homóloga acontece com menor frequência em que NHEJ. No nosso caso, a eficiência da inserção da sequência para disrupção no local de interesse dos genes MOB1A e MOB1B foi de 1.27% (1 clone nulo * 100% / 79 clones analisados). A eficiência pode ser aumentada por uso apenas de um gRNA em vez de três gRNA para cada gene. Além disso, há outras duas regiões no genoma de cada MOB1 que CRISPR afetou, ou seja, os clones que mostravam o resultado negativo para inserção no local de estudo podem ter inserção bi-alélica noutros locais. E os clones que mostravam o resultado de inserção heteroalélico podem ser uma mistura de células que resultou por contaminação de amostras.

Foram observados vários fenótipos durante o estudo da função de MOB1A e de MOB1B.

A observação das pontes de cromatina obtidos foram no clone nulo do MOB1A (RFA 2), tal como nos clones heteroalélicos do Mob1B (RFB 123 e RFB 17). Este fenótipo parece assim resultado da deleção/inativação dos genes MOB1A e do MOB1B. A probabilidade de ser um efeito num local não específico (*offtarget*) é baixa, porque as pontes de cromatina são detetadas em três clones distintos com os gRNAs desenhados para genes diferentes.

A origem do aparecimento das pontes de cromatina não foi analisada devido ao fim do prazo da dissertação. A existência de pontes de cromatina sugere que a célula falhou num dos passos da separação dos cromátídeos irmãos, ou seja, estes estão ligados entre duas células. Uma das possíveis razões da falha da separação dos cromátídeos é ativação da via NoCut [108]. A via NoCut impede o corte final da membrana durante a citocinese que forma duas células filhas separadas. A inibição do corte pode ser provocada por causa dos cromossomas em atraso que recrutam a Aurora B [108]. A Aurora B junto com Boi1 e Boi2 funcionam como inibidores abscisão [108]. O próximo passo necessário é descobrir se a origem do aparecimento das pontes de cromatina é provocada por Aurora B ou não. A resolução dos erros que levam ao aparecimento das pontes de cromatina é crítico para a célula. Este defeito significa que a célula mesmo tendo os erros no DNA avançou na mitose. O MOB1 diretamente ou indiretamente afeta um dos *checkpoints* responsável por deteção de erros associados a DNA. Em levedura Mob1 interage com Cdc14 e esta interação é necessária para saída da mitose [17]. Em humanos há dois homólogos de Cdc14, são CDC14A e CDC14B. Consoante a base de dados STRING (www.string-db.org, Agosto 2017), que mostra interação entre proteínas, os MOB1A/B interagem com CDC14A/B. O CDC14A é necessário para a separação dos centríolos e citocinese produtiva durante a divisão celular [109],[110]. Além disso, os estudos sobre a função demonstram que o CDC14A é responsável por migração e adesão das células [111].

Outros estudos demonstraram que CDC14A regula negativamente CDC25, que por sua vez controla a transição G2/M por ativação de CDK1-ciclina B [112]. Outro estudo independente mostra que CDC14B também regula transição G2/M por regulação negativa de CDC25 que afeta CDK1-ciclina B [113], ou seja, esta função ficou conservada durante a evolução. A regulação negativa do CDC14B resulta em envelhecimento rápido em ratos [114]. O mais interessante é que os CDC14A/B conseguem regular o APC, por desfosforilação do Cdh1 [115],[116] e a reparação dos DSBs [117]. Concluindo, a falta dos MOB1s pode provocar desregulação na correção dos erros no DNA e desregulação do APC, que no final resulta no avanço do ciclo celular mesmo havendo erros no DNA para corrigir.

Há três possíveis resultados que podem acontecer às células que estão ligados por pontes de cromatina. O primeiro resultado é o mais otimístico em que a célula consegue corrigir os erros associados a DNA e vai ocorrer citocinese normal. Um segundo resultado é se a célula não conseguir corrigir os erros associados a DNA e isto poderá provocar apoptose celular. E um terceiro resultado, e o pior de todos, em que a célula não consegue corrigir os erros associados a DNA e avança na citocinese e corta a ponta de cromatina. Este corte da ponte de cromatina leva a um corte de DNA inespecífico. Este corte do DNA vai mobilizar a maquinaria da correção dos cortes DBS e tentar corrigir os erros. Se a maquinaria falhar pode levar à apoptose celular ou não. Uma das possíveis consequências será a transformação das células em células cancerígenas.

Em relação aos outros fenótipos observados, as células gigantes e as células multinucleadas, proponho uma explicação. O volume das células é diretamente proporcional a quantidade de material genético, ou seja, as células que têm o dobro do tamanho têm o dobro do material genético. A célula atinge estas dimensões quando colapsa o fuso mitótico (fig. 4.1 A) e se forma um núcleo grande que tem o dobro do material genético. No caso das células multinucleadas pode ter acontecido a falha durante a citocinese, ou seja, formam-se dois núcleos distintos, mas não acontece a separação das células. (fig. 4.1 B). As células gigantes têm tamanho cerca de 10 vezes superior a tamanho das outras células (fig. 3.26). Isto sugere que houve sucessivos colapsos da mitose. Por outra palavras a célula tentou de multiplicar varias vezes, mas falhou em todas.

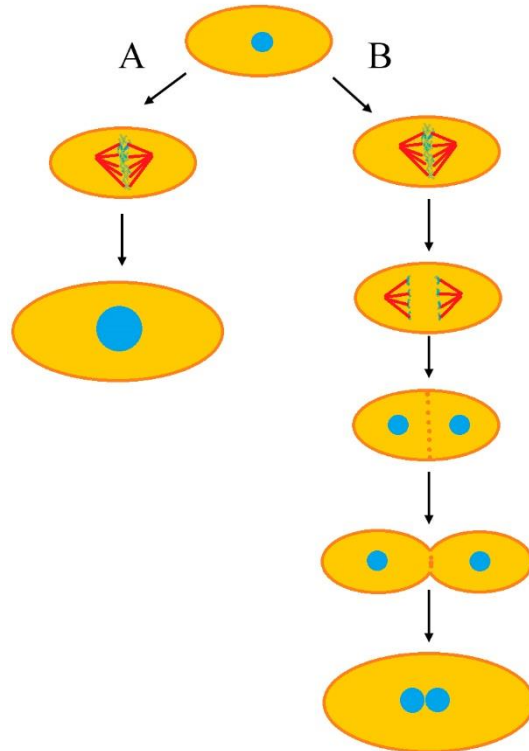


Figura 4.1. Esquema ilustrativa de formação de células gigantes e multinucleadas. **A** – formação de célula gigante e uninucleada é a consequência do colapso de fuso mitótico. **B** – formação de célula multinucleada é a consequência da falha durante citocinese.

Um segundo projeto onde tive oportunidade de trabalhar foi sobre gene ASPM. O gene ASPM foi descoberto em *Drosophila* (ASP) e mutações do gene causam formação anormal dos fusos mitóticos [100]. Os estudos seguintes demonstraram que o ASP está associado aos polos do fuso mitótico, à extremidade menos dos microtúbulos [102]. O ASP consegue interligar os microtúbulos entre si [102]. Por outro, lado a deleção do ASPM em células humanas não demonstrou nenhuma anomalias durante mitose [107].

No projeto relacionado com estudo do ASPM e ASP verifiquei que o nosso stock de moscas mutantes $ASP^{4/195}$ ao longo de passagens deixou de ser heteroalelico para deleção. Foi confirmado por PCR que o nosso stock perdeu o alelo 195, ou seja, stock passou de ser apenas $ASP^{4/4}$. Isto parece significar que os indivíduos com deleção $ASP^{4/4}$ são mais robustos do que os mutantes $ASP^{4/195}$ e $ASP^{195/195}$. Curiosamente, a deleção perdida ao longo das passagens é a que tira uma maior porção do gene (fig. 3.29). É possível que o tamanho do fragmento deletado influencie a robustez do animal.

Como as mutações do ASP causam microcefalia em *Drosophila*, os nossos mutantes têm os cérebros mais pequenos do que as moscas selvagens. Quando comecei a trabalhar no laboratório usei as moscas mantidas a 25°C e tinham o fenótipo da microcefalia confirmado por mim. Passando algum tempo a nossa incubadora avariou, e passei os stocks para 18°C. E nesta altura notou-se que cérebros mutantes tinham tamanho normal.

A variação do tamanho de cérebro com a temperatura pode ser justificada com a variação do metabolismo. Com o aumento da temperatura aumenta o metabolismo nos animais poiquilotérmicos. Por isso esta variação de temperatura na biologia usa-se para manter os stocks de *Drosophila*, porque quando colocamos as moscas a temperatura 18°C o metabolismo deles baixa, ou seja, eles consomem menos alimento e reproduzem-se mais lentamente, que torna a manutenção do stock mais barato.

Com a diminuição do metabolismo todos os processos bioquímicos no organismo ficam mais lentos e a célula tem mais tempo para corrigir os erros durante ciclo celular. Assim, é possível que na ausência do ASP e a 18°C as células tenham mais tempo para corrigir os erros do fuso mitótico. Para testar esta hipótese pode-se fazer microscopia em tempo real e ver se as células têm mal alinhamento dos microtúbulos no início da mitose que com tempo ficam corrigidas.

5. Conclusão

A tecnologia CRISPR/Cas9 sendo ser uma técnica de fácil aplicação da engenharia genética ainda tem os problemas com eficácia. O método do CRISPR utilizado no nosso laboratório, adquirido a Santa Cruz, implica a inserção do HDR. O HDR tem a sequência de um gene que permite fazer a seleção dos clones onde ocorreu a inserção do HDR, com possível alteração do genoma. Esta inserção ocorre por recombinação homóloga. No nosso caso foi analisado 39 clones de MOB1A dos quais se obteve 1 clone nulo, que resulta redondamente em 2%. No caso do MOB1B foram analisados 40 clones e não se obteve nenhum clone nulo.

O objetivo deste trabalho era descobrir e distinguir as funções únicas do MOB1A e do MOB1B, e quais as funções que os dois têm em comum. Com o trabalho agora realizado não é possível concluir se o MOB1A tem funções diferentes ou comuns com o MOB1B. No período de tempo dado não consegui descobrir e distinguir as funções dos MOB1s. O próximo passo que tem de ser feito é o aumento dos clones nulos nas células HeLa e criação dos clones nulos em linha primária para excluir o efeito do *offtarget* e heterogeneidade/fenótipo específico das células HeLa.

Os nossos resultados contribuem para um melhor conhecimento da função dos MOB1A e do MOB1B em células humanas. Foram descritos fenótipos da deleção dos MOB1A/B pela primeira vez que podem dar pistas para futura investigação.

Os resultados obtidos da função do ASPM em *Drosophila* mostram que o fenótipo da microcefalia é dependente da temperatura, ou seja, onde o fator principal pode ser o tempo necessário para mitose.

6. Bibliografia

- [1] E. Noguchi, M. C. Gadaleta, and Springer Science+Business Media, *Cell cycle control : mechanisms and protocols*, no. 1170. 2014.
- [2] M. Glotzer, “Cytokinesis in Metazoa and Fungi,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 9, no. 10, p. a022343, Oct. 2017.
- [3] M. H. Glickman and A. Ciechanover, “The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction,” *Physiol. Rev.*, vol. 82, no. 2, pp. 373–428, Apr. 2002.
- [4] J.-M. Peters, “The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy.,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 9, pp. 644–56, Sep. 2006.
- [5] E. Manchado, M. Eguren, and M. Malumbres, “The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C): cell-cycle-dependent and -independent functions,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 38, no. 1, pp. 65–71, Feb. 2010.
- [6] J. D. Bishop and J. M. Schumacher, “Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B Kinase stimulates Aurora B kinase activity.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 31, pp. 27577–80, Aug. 2002.
- [7] A. E. Kelly, C. Ghenoiu, J. Z. Xue, C. Zierhut, H. Kimura, and H. Funabiki, “Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B.,” *Science*, vol. 330, no. 6001, pp. 235–9, Oct. 2010.
- [8] A. L. Brittle, Y. Nanba, T. Ito, and H. Ohkura, “Concerted action of Aurora B, Polo and NHK-1 kinases in centromere-specific histone 2A phosphorylation.,” *Exp. Cell Res.*, vol. 313, no. 13, pp. 2780–5, Aug. 2007.
- [9] D. Killander and A. Zetterberg, “A quantitative cytochemical investigation of the relationship between cell mass and initiation of DNA synthesis in mouse fibroblasts in vitro.,” *Exp. Cell Res.*, vol. 40, no. 1, pp. 12–20, Oct. 1965.
- [10] D. KILLANDER and A. ZETTERBERG, “QUANTITATIVE CYTOCHEMICAL STUDIES ON INTERPHASE GROWTH. I. DETERMINATION OF DNA, RNA AND MASS CONTENT OF AGE DETERMINED MOUSE FIBROBLASTS IN VITRO AND OF INTERCELLULAR VARIATION IN GENERATION TIME.,” *Exp. Cell Res.*, vol. 38, pp. 272–84, May 1965.
- [11] C. Tapia-Alveal, T. M. Calonge, and M. J. O’Connell, “Regulation of chk1.,” *Cell Div.*, vol. 4, no. 1, p. 8, Apr. 2009.

- [12] L. A. Carvajal, P.-J. Hamard, C. Tonnessen, and J. J. Manfredi, “E2F7, a novel target, is up-regulated by p53 and mediates DNA damage-dependent transcriptional repression.,” *Genes Dev.*, vol. 26, no. 14, pp. 1533–45, Jul. 2012.
- [13] S. St Clair *et al.*, “DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the cdc25C promoter.,” *Mol. Cell*, vol. 16, no. 5, pp. 725–36, Dec. 2004.
- [14] L. A. Carvajal and J. J. Manfredi, “Another fork in the road—life or death decisions by the tumour suppressor p53,” *EMBO Rep.*, vol. 14, no. 5, pp. 414–421, Apr. 2013.
- [15] V. Sudakin, G. K. T. Chan, and T. J. Yen, “Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2,” *J. Cell Biol.*, vol. 154, no. 5, pp. 925–936, Sep. 2001.
- [16] T. Lischetti and J. Nilsson, “Regulation of mitotic progression by the spindle assembly checkpoint,” *Mol. Cell. Oncol.*, vol. 2, no. 1, p. e970484, Jan. 2015.
- [17] J. Culotti and L. H. Hartwell, “Genetic control of the cell division cycle in yeast. 3. Seven genes controlling nuclear division.,” *Exp. Cell Res.*, vol. 67, no. 2, pp. 389–401, Aug. 1971.
- [18] W. Shou *et al.*, “Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex.,” *Cell*, vol. 97, no. 2, pp. 233–44, Apr. 1999.
- [19] A. Clemente-Blanco *et al.*, “Cdc14 phosphatase promotes segregation of telomeres through repression of RNA polymerase II transcription.,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 12, pp. 1450–6, Oct. 2011.
- [20] M. Guillaumot *et al.*, “Cdc14b regulates mammalian RNA polymerase II and represses cell cycle transcription.,” *Sci. Rep.*, vol. 1, no. 1, p. 189, Dec. 2011.
- [21] I. Calabria, B. Baro, J.-A. Rodriguez-Rodriguez, N. Russiñol, and E. Queralt, “Zds1 regulates PP2A(Cdc55) activity and Cdc14 activation during mitotic exit through its Zds_C motif.,” *J. Cell Sci.*, vol. 125, no. Pt 12, pp. 2875–84, Jun. 2012.
- [22] R. Azzam *et al.*, “Phosphorylation by cyclin B-Cdk underlies release of mitotic exit activator Cdc14 from the nucleolus.,” *Science*, vol. 305, no. 5683, pp. 516–9, Jul. 2004.
- [23] J. M. Rock and A. Amon, “The FEAR network,” *Curr. Biol.*, vol. 19, no. 23, pp. R1063–R1068, Dec. 2009.
- [24] G. Pereira and E. Schiebel, “Separase regulates INCENP-Aurora B anaphase spindle function through Cdc14.,” *Science*, vol. 302, no. 5653, pp. 2120–4, Dec. 2003.

- [25] M. Sullivan, T. Higuchi, V. L. Katis, and F. Uhlmann, “Cdc14 phosphatase induces rDNA condensation and resolves cohesin-independent cohesion during budding yeast anaphase.,” *Cell*, vol. 117, no. 4, pp. 471–82, May 2004.
- [26] T. Higuchi and F. Uhlmann, “Stabilization of microtubule dynamics at anaphase onset promotes chromosome segregation.,” *Nature*, vol. 433, no. 7022, pp. 171–6, Jan. 2005.
- [27] F. Monje-Casas and A. Amon, “Cell polarity determinants establish asymmetry in MEN signaling.,” *Dev. Cell*, vol. 16, no. 1, pp. 132–45, Jan. 2009.
- [28] J. E. Falk, L. Y. Chan, and A. Amon, “Lte1 promotes mitotic exit by controlling the localization of the spindle position checkpoint kinase Kin4.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 31, pp. 12584–90, Aug. 2011.
- [29] K. E. D’Aquino *et al.*, “The protein kinase Kin4 inhibits exit from mitosis in response to spindle position defects.,” *Mol. Cell*, vol. 19, no. 2, pp. 223–34, Jul. 2005.
- [30] F. Hu, Y. Wang, D. Liu, Y. Li, J. Qin, and S. J. Elledge, “Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP complex by Cdc5 and cell cycle checkpoints.,” *Cell*, vol. 107, no. 5, pp. 655–65, Nov. 2001.
- [31] D. A. Mohl, M. J. Huddleston, T. S. Collingwood, R. S. Annan, and R. J. Deshaies, “Dbf2-Mob1 drives relocalization of protein phosphatase Cdc14 to the cytoplasm during exit from mitosis.,” *J. Cell Biol.*, vol. 184, no. 4, pp. 527–39, Feb. 2009.
- [32] D. Knapp, L. Bhoite, D. J. Stillman, and K. Nasmyth, “The transcription factor Swi5 regulates expression of the cyclin kinase inhibitor p40SIC1.,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, no. 10, pp. 5701–7, Oct. 1996.
- [33] M. Jaquenoud, F. van Drogen, and M. Peter, “Cell cycle-dependent nuclear export of Cdh1p may contribute to the inactivation of APC/C(Cdh1).,” *EMBO J.*, vol. 21, no. 23, pp. 6515–26, Dec. 2002.
- [34] C. König, H. Maekawa, and E. Schiebel, “Mutual regulation of cyclin-dependent kinase and the mitotic exit network,” *J. Cell Biol.*, vol. 188, no. 3, pp. 351–368, Feb. 2010.
- [35] F. C. Luca, M. Mody, C. Kurischko, D. M. Roof, T. H. Giddings, and M. Winey, “*Saccharomyces cerevisiae* Mob1p Is Required for Cytokinesis and Mitotic Exit,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 21, no. 20, pp. 6972–6983, Oct. 2001.
- [36] J. Jimenez, B. A. Castelao, A. Gonzalez-Novo, and M. Sanchez-Perez, “The role of MEN (mitosis exit network) proteins in the cytokinesis of *Saccharomyces cerevisiae*.,” *Int. Microbiol.*, vol. 8, no. 1, pp. 33–42, Mar. 2005.
- [37] L. M. Frenz, S. E. Lee, D. Fesquet, and L. H. Johnston, “The budding yeast Dbf2 protein

- kinase localises to the centrosome and moves to the bud neck in late mitosis.," *J. Cell Sci.*, vol. 113 Pt 19, pp. 3399–408, Oct. 2000.
- [38] S. Song, T. Z. Grenfell, S. Garfield, R. L. Erikson, and K. S. Lee, "Essential function of the polo box of Cdc5 in subcellular localization and induction of cytokinetic structures.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, no. 1, pp. 286–98, Jan. 2000.
- [39] J. Lippincott, K. B. Shannon, W. Shou, R. J. Deshaies, and R. Li, "The Tem1 small GTPase controls actomyosin and septin dynamics during cytokinesis.," *J. Cell Sci.*, vol. 114, no. Pt 7, pp. 1379–86, Apr. 2001.
- [40] R. Nishihama *et al.*, "Role of Inn1 and its interactions with Hof1 and Cyk3 in promoting cleavage furrow and septum formation in *S. cerevisiae*." *J. Cell Biol.*, vol. 185, no. 6, pp. 995–1012, Jun. 2009.
- [41] F. Meitinger, S. Palani, B. Hub, and G. Pereira, "Dual function of the NDR-kinase Dbf2 in the regulation of the F-BAR protein Hof1 during cytokinesis.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 24, no. 9, pp. 1290–304, May 2013.
- [42] S. Yoshida *et al.*, "Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis.," *Science*, vol. 313, no. 5783, pp. 108–11, Jul. 2006.
- [43] M. E. Burkard *et al.*, "Chemical genetics reveals the requirement for Polo-like kinase 1 activity in positioning RhoA and triggering cytokinesis in human cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 11, pp. 4383–8, Mar. 2007.
- [44] F. Meitinger *et al.*, "Phosphorylation-dependent regulation of the F-BAR protein Hof1 during cytokinesis.," *Genes Dev.*, vol. 25, no. 8, pp. 875–88, Apr. 2011.
- [45] K. F. Harvey, C. M. Pflieger, and I. K. Hariharan, "The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis.," *Cell*, vol. 114, no. 4, pp. 457–67, Aug. 2003.
- [46] Z.-C. Lai *et al.*, "Control of Cell Proliferation and Apoptosis by Mob as Tumor Suppressor, Mats," *Cell*, vol. 120, no. 5, pp. 675–685, Mar. 2005.
- [47] N. Tapon *et al.*, "salvador Promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines.," *Cell*, vol. 110, no. 4, pp. 467–78, Aug. 2002.
- [48] S. Wu, J. Huang, J. Dong, and D. Pan, "hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts.," *Cell*, vol. 114, no. 4, pp. 445–56, Aug. 2003.
- [49] J. Huang, S. Wu, J. Barrera, K. Matthews, and D. Pan, "The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the

- Drosophila* Homolog of YAP.,” *Cell*, vol. 122, no. 3, pp. 421–34, Aug. 2005.
- [50] B. A. Callus, A. M. Verhagen, and D. L. Vaux, “Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation.,” *FEBS J.*, vol. 273, no. 18, pp. 4264–76, Sep. 2006.
- [51] E. H. Y. Chan, M. Nousiainen, R. B. Chalamalasetty, A. Schäfer, E. A. Nigg, and H. H. W. Silljé, “The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1.,” *Oncogene*, vol. 24, no. 12, pp. 2076–86, Mar. 2005.
- [52] M. Praskova, F. Xia, and J. Avruch, “MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation.,” *Curr. Biol.*, vol. 18, no. 5, pp. 311–21, Mar. 2008.
- [53] F. Yin, J. Yu, Y. Zheng, Q. Chen, N. Zhang, and D. Pan, “Spatial organization of Hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor Merlin/NF2.,” *Cell*, vol. 154, no. 6, pp. 1342–55, Sep. 2013.
- [54] Q.-Y. Lei *et al.*, “TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway.,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 28, no. 7, pp. 2426–36, Apr. 2008.
- [55] H. Oh and K. D. Irvine, “In vivo regulation of Yorkie phosphorylation and localization,” *Development*, vol. 135, no. 6, pp. 1081–1088, Feb. 2008.
- [56] S. Wu, Y. Liu, Y. Zheng, J. Dong, and D. Pan, “The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway.,” *Dev. Cell*, vol. 14, no. 3, pp. 388–98, Mar. 2008.
- [57] L. Zhang, F. Ren, Q. Zhang, Y. Chen, B. Wang, and J. Jiang, “The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control.,” *Dev. Cell*, vol. 14, no. 3, pp. 377–87, Mar. 2008.
- [58] B. Zhao *et al.*, “TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control.,” *Genes Dev.*, vol. 22, no. 14, pp. 1962–71, Jul. 2008.
- [59] X. Dai *et al.*, “Phosphorylation of angiomin by Lats1/2 kinases inhibits F-actin binding, cell migration, and angiogenesis.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 47, pp. 34041–51, Nov. 2013.
- [60] C. Y. Leung and M. Zernicka-Goetz, “Angiomin prevents pluripotent lineage differentiation in mouse embryos via Hippo pathway-dependent and -independent mechanisms.,” *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 2251, Aug. 2013.

- [61] S. W. Chan, C. J. Lim, Y. F. Chong, A. V. Pobbati, C. Huang, and W. Hong, “Hippo pathway-independent restriction of TAZ and YAP by angiomin.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 9, pp. 7018–26, Mar. 2011.
- [62] W. Wang, J. Huang, and J. Chen, “Angiomin-like proteins associate with and negatively regulate YAP1.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 6, pp. 4364–70, Feb. 2011.
- [63] K. Schlegelmilch *et al.*, “Yap1 acts downstream of α -catenin to control epidermal proliferation.,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 782–95, Mar. 2011.
- [64] S. Dupont *et al.*, “Role of YAP/TAZ in mechanotransduction,” *Nature*, vol. 474, no. 7350, pp. 179–183, Jun. 2011.
- [65] K.-I. Wada, K. Itoga, T. Okano, S. Yonemura, and H. Sasaki, “Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers.,” *Development*, vol. 138, no. 18, pp. 3907–14, Sep. 2011.
- [66] B. Zhao, L. Li, L. Wang, C.-Y. Wang, J. Yu, and K.-L. Guan, “Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis.,” *Genes Dev.*, vol. 26, no. 1, pp. 54–68, Jan. 2012.
- [67] B. Zhao *et al.*, “Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control.,” *Genes Dev.*, vol. 21, no. 21, pp. 2747–61, Nov. 2007.
- [68] F.-X. Yu *et al.*, “Regulation of the Hippo-YAP Pathway by G-Protein-Coupled Receptor Signaling,” *Cell*, vol. 150, no. 4, pp. 780–791, Aug. 2012.
- [69] M. Kim *et al.*, “cAMP/PKA signalling reinforces the LATS-YAP pathway to fully suppress YAP in response to actin cytoskeletal changes.,” *EMBO J.*, vol. 32, no. 11, pp. 1543–55, May 2013.
- [70] B. V. V. G. Reddy and K. D. Irvine, “Regulation of Hippo signaling by EGFR-MAPK signaling through Ajuba family proteins.,” *Dev. Cell*, vol. 24, no. 5, pp. 459–71, Mar. 2013.
- [71] R. Baumgartner, I. Poernbacher, N. Buser, E. Hafen, and H. Stocker, “The WW Domain Protein Kibra Acts Upstream of Hippo in Drosophila,” *Dev. Cell*, vol. 18, no. 2, pp. 309–316, Feb. 2010.
- [72] J. Yu, Y. Zheng, J. Dong, S. Klusza, W.-M. Deng, and D. Pan, “Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded.,” *Dev. Cell*, vol. 18, no. 2, pp. 288–99, Feb. 2010.
- [73] L. Angus *et al.*, “Willin/FRMD6 expression activates the Hippo signaling pathway

- kinases in mammals and antagonizes oncogenic YAP.,” *Oncogene*, vol. 31, no. 2, pp. 238–50, Jan. 2012.
- [74] A. Hergovich, “Regulation and functions of mammalian LATS/NDR kinases: looking beyond canonical Hippo signalling.,” *Cell Biosci.*, vol. 3, no. 1, p. 32, Aug. 2013.
- [75] A. Hergovich, S. Lamla, E. A. Nigg, and B. A. Hemmings, “Centrosome-associated NDR kinase regulates centrosome duplication.,” *Mol. Cell*, vol. 25, no. 4, pp. 625–34, Feb. 2007.
- [76] M. Ji, S. Yang, Y. Chen, L. Xiao, L. Zhang, and J. Dong, “Phospho-regulation of KIBRA by CDK1 and CDC14 phosphatase controls cell-cycle progression.,” *Biochem. J.*, vol. 447, no. 1, pp. 93–102, Oct. 2012.
- [77] A. Mocchiari and E. Schiebel, “Cdc14: a highly conserved family of phosphatases with non-conserved functions?,” *J. Cell Sci.*, vol. 123, no. Pt 17, pp. 2867–76, Sep. 2010.
- [78] F. Zanconato *et al.*, “Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth.,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 17, no. 9, pp. 1218–27, Sep. 2015.
- [79] S. Yang *et al.*, “CDK1 phosphorylation of YAP promotes mitotic defects and cell motility and is essential for neoplastic transformation.,” *Cancer Res.*, vol. 73, no. 22, pp. 6722–33, Nov. 2013.
- [80] L. Zhang, X. Chen, S. Stauffer, S. Yang, Y. Chen, and J. Dong, “CDK1 phosphorylation of TAZ in mitosis inhibits its oncogenic activity.,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 31, pp. 31399–412, Oct. 2015.
- [81] J. M. Rock *et al.*, “Activation of the yeast Hippo pathway by phosphorylation-dependent assembly of signaling complexes.,” *Science*, vol. 340, no. 6134, pp. 871–5, May 2013.
- [82] C. Florindo, J. Perdigão, D. Fesquet, E. Schiebel, J. Pines, and A. A. Tavares, “Human Mob1 proteins are required for cytokinesis by controlling microtubule stability.,” *J. Cell Sci.*, vol. 125, no. Pt 13, pp. 3085–90, Jul. 2012.
- [83] T. Chiyoda *et al.*, “LATS1/WARTS phosphorylates MYPT1 to counteract PLK1 and regulate mammalian mitotic progression.,” *J. Cell Biol.*, vol. 197, no. 5, pp. 625–41, May 2012.
- [84] K. Masuda *et al.*, “LATS1 and LATS2 Phosphorylate CDC26 to Modulate Assembly of the Tetrapeptide Repeat Subcomplex of APC/C,” *PLoS One*, vol. 10, no. 2, p. e0118662, Feb. 2015.
- [85] B. Baro, J.-A. Rodriguez-Rodriguez, I. Calabria, M. L. Hernáez, C. Gil, and E. Queralt,

- “Dual Regulation of the mitotic exit network (MEN) by PP2A-Cdc55 phosphatase.” *PLoS Genet.*, vol. 9, no. 12, p. e1003966, Dec. 2013.
- [86] F. C. Luca and M. Winey, “MOB1, an essential yeast gene required for completion of mitosis and maintenance of ploidy.” *Mol. Biol. Cell*, vol. 9, no. 1, pp. 29–46, Jan. 1998.
- [87] T. Shimizu, L.-L. Ho, and Z.-C. Lai, “The mob as tumor suppressor gene is essential for early development and regulates tissue growth in *Drosophila*.” *Genetics*, vol. 178, no. 2, pp. 957–65, Feb. 2008.
- [88] A. Hergovich, D. Schmitz, and B. A. Hemmings, “The human tumour suppressor LATS1 is activated by human MOB1 at the membrane.” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 345, no. 1, pp. 50–8, Jun. 2006.
- [89] A. Hergovich, S. J. Bichsel, and B. A. Hemmings, “Human NDR kinases are rapidly activated by MOB proteins through recruitment to the plasma membrane and phosphorylation.” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 18, pp. 8259–72, Sep. 2005.
- [90] L. J. Wilmeth, S. Shrestha, G. Montañó, J. Rashe, and C. B. Shuster, “Mutual dependence of Mob1 and the chromosomal passenger complex for localization during mitosis.” *Mol. Biol. Cell*, vol. 21, no. 3, pp. 380–92, Feb. 2010.
- [91] M. Nishio *et al.*, “Cancer susceptibility and embryonic lethality in Mob1a/1b double-mutant mice.” *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no. 12, pp. 4505–18, Dec. 2012.
- [92] K. Otsubo *et al.*, “MOB1-YAP1/TAZ-NKX2.1 axis controls bronchioalveolar cell differentiation, adhesion and tumour formation.” *Oncogene*, vol. 36, no. 29, pp. 4201–4211, Jul. 2017.
- [93] N. Nishioka *et al.*, “The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass.” *Dev. Cell*, vol. 16, no. 3, pp. 398–410, Mar. 2009.
- [94] Y. He *et al.*, “*Drosophila* Mob family proteins interact with the related tricornered (Trc) and warts (Wts) kinases.” *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, no. 9, pp. 4139–52, Sep. 2005.
- [95] R. S. Kohler, D. Schmitz, H. Cornils, B. A. Hemmings, and A. Hergovich, “Differential NDR/LATS interactions with the human MOB family reveal a negative role for human MOB2 in the regulation of human NDR kinases.” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 30, no. 18, pp. 4507–20, Sep. 2010.
- [96] V. Gomez *et al.*, “Regulation of DNA damage responses and cell cycle progression by hMOB2.” *Cell. Signal.*, vol. 27, no. 2, pp. 326–39, Feb. 2015.
- [97] F. Tang *et al.*, “hMOB3 modulates MST1 apoptotic signaling and supports tumor growth

- in glioblastoma multiforme.,” *Cancer Res.*, vol. 74, no. 14, pp. 3779–89, Jul. 2014.
- [98] J. Schulte *et al.*, “DMob4/Phocein regulates synapse formation, axonal transport, and microtubule organization.,” *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 15, pp. 5189–203, Apr. 2010.
- [99] M. A. Trammell, N. M. Mahoney, D. A. Agard, and R. D. Vale, “Mob4 plays a role in spindle focusing in *Drosophila* S2 cells.,” *J. Cell Sci.*, vol. 121, no. Pt 8, pp. 1284–92, Apr. 2008.
- [100] P. Ripoll, S. Pimpinelli, M. M. Valdivia, and J. Avila, “A cell division mutant of *Drosophila* with a functionally abnormal spindle.,” *Cell*, vol. 41, no. 3, pp. 907–12, Jul. 1985.
- [101] J. G. Wakefield, S. Bonaccorsi, and M. Gatti, “The *drosophila* protein asp is involved in microtubule organization during spindle formation and cytokinesis.,” *J. Cell Biol.*, vol. 153, no. 4, pp. 637–48, May 2001.
- [102] A. Ito and G. Goshima, “Microcephaly protein Asp focuses the minus ends of spindle microtubules at the pole and within the spindle.,” *J. Cell Biol.*, vol. 211, no. 5, pp. 999–1009, Dec. 2015.
- [103] M. A. Rujano, L. Sanchez-Pulido, C. Penner, G. le Dez, and R. Basto, “The microcephaly protein Asp regulates neuroepithelium morphogenesis by controlling the spatial distribution of myosin II.,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 11, pp. 1294–306, Nov. 2013.
- [104] D. Jayaraman *et al.*, “Microcephaly Proteins Wdr62 and Aspm Define a Mother Centriole Complex Regulating Centriole Biogenesis, Apical Complex, and Cell Fate.,” *Neuron*, vol. 92, no. 4, pp. 813–828, Nov. 2016.
- [105] R. Insolera, H. Bazzi, W. Shao, K. V Anderson, and S.-H. Shi, “Cortical neurogenesis in the absence of centrioles.,” *Nat. Neurosci.*, vol. 17, no. 11, pp. 1528–35, Nov. 2014.
- [106] J. Higgins *et al.*, “Human ASPM participates in spindle organisation, spindle orientation and cytokinesis.,” *BMC Cell Biol.*, vol. 11, no. 1, p. 85, Nov. 2010.
- [107] E. A. Tungadi, A. Ito, T. Kiyomitsu, and G. Goshima, “Human microcephaly ASPM protein is a spindle pole-focusing factor that functions redundantly with CDK5RAP2.,” *J. Cell Sci.*, vol. 130, no. 21, pp. 3676–3684, Nov. 2017.
- [108] C. Norden, M. Mendoza, J. Dobbelaere, C. V Kotwaliwale, S. Biggins, and Y. Barral, “The NoCut pathway links completion of cytokinesis to spindle midzone function to prevent chromosome breakage.,” *Cell*, vol. 125, no. 1, pp. 85–98, Apr. 2006.
- [109] N. Mailand, C. Lukas, B. K. Kaiser, P. K. Jackson, J. Bartek, and J. Lukas, “Deregulated

- human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation.,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 4, no. 4, pp. 317–22, Apr. 2002.
- [110] B. K. Kaiser, Z. A. Zimmerman, H. Charbonneau, and P. K. Jackson, “Disruption of centrosome structure, chromosome segregation, and cytokinesis by misexpression of human Cdc14A phosphatase.,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 13, no. 7, pp. 2289–300, Jul. 2002.
- [111] N.-P. Chen, B. Uddin, R. Voit, and E. Schiebel, “Human phosphatase CDC14A is recruited to the cell leading edge to regulate cell migration and adhesion.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 4, pp. 990–5, Jan. 2016.
- [112] M. P. Sacristán, S. Ovejero, and A. Bueno, “Human Cdc14A becomes a cell cycle gene in controlling Cdk1 activity at the G₂/M transition.,” *Cell Cycle*, vol. 10, no. 3, pp. 387–91, Feb. 2011.
- [113] I. Tumurbaatar, O. Cizmecioglu, I. Hoffmann, I. Grummt, and R. Voit, “Human Cdc14B promotes progression through mitosis by dephosphorylating Cdc25 and regulating Cdk1/cyclin B activity.,” *PLoS One*, vol. 6, no. 2, p. e14711, Feb. 2011.
- [114] Z. Wei *et al.*, “Early-onset aging and defective DNA damage response in Cdc14b-deficient mice.,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 31, no. 7, pp. 1470–7, Apr. 2011.
- [115] J. Bembenek and H. Yu, “Regulation of the anaphase-promoting complex by the dual specificity phosphatase human Cdc14a.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 51, pp. 48237–42, Dec. 2001.
- [116] F. Bassermann, D. Frescas, D. Guardavaccaro, L. Busino, A. Peschiaroli, and M. Pagano, “The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G₂ DNA-damage-response checkpoint.,” *Cell*, vol. 134, no. 2, pp. 256–67, Jul. 2008.
- [117] H. Lin *et al.*, “Cdc14A and Cdc14B Redundantly Regulate DNA Double-Strand Break Repair.,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 35, no. 21, pp. 3657–68, Nov. 2015.
- [118] I. Scarfone and S. Piatti, “Coupling spindle position with mitotic exit in budding yeast: The multifaceted role of the small GTPase Tem1.,” *Small GTPases*, vol. 6, no. 4, pp. 196–201, Oct. 2015.
- [119] F.-X. Yu, Z. Meng, S. W. Plouffe, and K.-L. Guan, “Hippo Pathway Regulation of Gastrointestinal Tissues,” *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 77, no. 1, pp. 201–227, Feb. 2015.

7. Anexos

ANEXO - I

Tabela 7.1. Descrição/composição de géis para SDS-PAGE.

Gel de concentração		Gel de resolução			
Percentagem do gel	5%	Percentagem do gel	8%	12%	15%
30% acrilamida:bisacrilamida (29:1)	510 μ l	30% acrilamida:bisacrilamida (29:1)	1.6 ml	2 ml	2.5 ml
1 M Tris-HCl pH 6.8	375 μ l	1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.5 ml	1.25 ml	1.25 ml
10% Persulfato de Amónia (PSA)	30 μ l	10% Persulfato de Amónia (PSA)	60 μ l	50 μ l	50 μ l
10% SDS	30 μ l	10% SDS	60 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED	3 μ l	TEMED	6 μ l	6 μ l	6 μ l
Água destilada	2.04 ml	Água destilada	2.78 ml	1.65 ml	1.15 ml

ANEXO - II

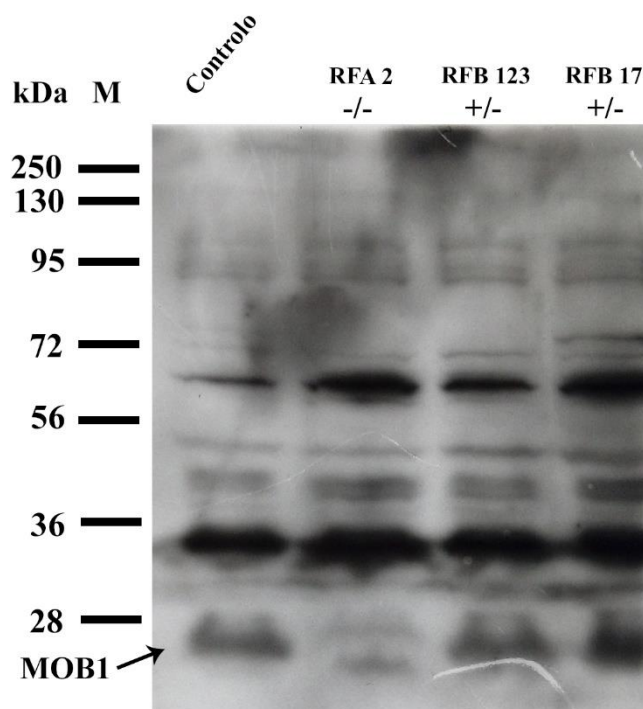


Figura 7.1. A análise por Western-Blot dos clones RFA2, RFB123 e RFB17, como anticorpo anti-mob1. Controlo – o Western-Blot feito a partir do extrato proteico das células HeLa não alteradas.