

**Carolina Isabel Ramos Gonçalves**

**Função da proteína Mob4/phocein na regulação  
da mitose**



**Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina**

**2021**



**Carolina Isabel Ramos Gonçalves**

**Função da proteína Mob4/phocein na regulação  
da mitose**

Mestrado em Oncobiologia- Mecanismos moleculares do cancro

Trabalho efetuado sob orientação de: Professor Doutor Álvaro

Tavares



**Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina 2021**

# **Função da proteína Mob4/phocein na regulação da mitose**

## **Declaração de autoria do trabalho**

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

---

Carolina Isabel Ramos Gonçalves

Copyright © Carolina Isabel Ramos Gonçalves

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.



# Agradecimentos

Ao Professor Doutor Álvaro Tavares, o meu orientador, por me ter aceite no seu laboratório, pela disponibilidade, partilha de conhecimentos e todos os seus conselhos.

À Doutora Cláudia Florindo por todos os seus ensinamentos na microscopia e pela sua disponibilidade para ajudar quando necessário.

À Inês e o Juan, os meus companheiros de laboratório, por estar sempre lá para me ajudar quando precisei, pela paciência e amizade.

Ao meu grupo de amigas desde sempre, Inês Videira, Inês Soveral, Letícia Blanc, Tatiana Lourenço e Rute Encarnação. Pelos muitos anos de amizade e ainda mais momentos de felicidade que me proporcionam. Por todo o apoio que me deram nos momentos mais difíceis desta caminhada. Vocês fazem de mim uma pessoa melhor e mais feliz e com ambição para nunca desistir e seguir em frente.

À FCT e à fundação CRESC do Algarve, por financiarem o projeto ALG-01-0145-FEDER-030014, que possibilitou ao meu trabalho.

Finalmente, obrigada àqueles sem os quais isto não seria possível, à minha avó por ser uma das paixões da minha vida e por me ter dado tanta força e à minha tia pela ajuda, pelas encomendas, mimos e pelas chamadas que tanta motivação me deram. À minha mãe, meu porto de abrigo, e ao meu pai por todo o carinho, apoio, preocupação e ajuda que me deram não só ao longo deste tempo, como durante toda a minha vida. A força que me dão é incomparável. Obrigada por me deixarem ser quem sou, por viverem a minha vida comigo e a meu lado. Sempre fizeram questão que eu acreditasse nas minhas capacidades e sempre quiseram que eu voasse longe e alto. Graças a vocês, fui e sou uma filha feliz.





## Resumo

O funcionamento correto da divisão celular é essencial para que o material genético seja transmitido, de forma que uma célula progenitora dê origem a duas células filhas geneticamente idênticas, assegurando a continuidade da vida. No caso deste processo ser comprometido, poderão surgir várias complicações como por exemplo o aparecimento de cancro. Os nossos estudos iniciais indicam que o gene humano Mob4/phocein é essencial para a execução da mitose, mais concretamente para o correto alinhamento dos cromossomas na placa metafásica durante a mitose, sugerindo que mutações neste gene poderá ser um dos fatores causadores da instabilidade genómica observada em células cancerosas. No entanto o mecanismo molecular de acção da Mob4/phocein está ainda por definir.

Pretende-se com este projeto determinar esse mecanismo. Para tal, o projeto iniciar-se-á com a criação de linhas celulares nulas para o Mob4/phocein, por CRISPR, e pela sua caracterização. Nestas linhas determinar-se-á de seguida a acumulação e atividade de proteínas centrossomais e do cinétocoro e analisar-se-ão os defeitos mitóticos resultantes da supressão completa do gene. Em simultâneo será analisado o fenótipo de linhas mutantes em peixe-zebra, nulas para o Mob4 e já criados por Marco Campinho do CCMAR. As técnicas a utilizar neste projeto incluem i) microscopia de células fixas, tanto por imunofluorescência como por análise de células a expressar proteínas marcadas com GFP e RFP; ii) supressão por CRISPR da expressão de genes em linhas celulares humanas (linhas tumorais e primárias); iii) transformação de células em cultura; iv) purificação e manipulação de ácidos nucleicos; v) expressão e purificação de proteínas.

Com o desenvolvimento deste projeto foi possível verificar e concluir que a nível das linhas celulares humanas, o CRISPr foi um sucesso quer a nível molecular quer a nível proteico; não parece haver influência na concentração total da proteína com o estímulo célula; a nível da co-localização de Mob4 com o Golgi em Hct-11, esta não parece existir; e infelizmente, não temos degradação indutível da proteína Mob4. Aquando do trabalho realizado em Zebrafish, foi possível o isolamento de 11 animais F1 carriers.

Com isto, é necessário determinar porque é que nas CRAL1 a Mob4-AID-GFP não tem degradação induzida por auxina e cruzar os animais carriers entre si, de forma a originar o mutante homocigótico nulo, e observar o seu fenótipo.

## Abstract

The correct functioning of cell division is essential for genetic material to be transmitted, so that a progenitor cell gives rise to two genetically identical daughter cells, ensuring the continuity of life. If this process is compromised, several complications may arise, such as the appearance of cancer. Our initial studies indicate that the human Mob4/phocein gene is essential for the execution of mitosis, specifically for the correct alignment of chromosomes in the metaphase plate during mitosis, suggesting that mutations in this gene may be one of the factors causing the observed genomic instability. in cancer cells. However, the molecular mechanism of action of Mob4/phocein is yet to be defined.

It is intended with this project to determine this mechanism. To this end, the project will begin with the creation of null cell lines for Mob4/phocein, by CRISPR, and by their characterization. In these lines, the accumulation and activity of centrosomal and kinetochore proteins will then be determined and the mitotic defects resulting from complete gene deletion will be analyzed. Simultaneously, the phenotype of mutant lines in zebrafish, null for Mob4 and already created by Marco Campinho of CCMAR, will be analyzed. The techniques to be used in this project include i) fixed cell microscopy, both by immunofluorescence and by analysis of cells expressing proteins tagged with GFP and RFP; ii) CRISPR suppression of gene expression in human cell lines (tumor and primary lines); iii) transformation of cells in culture; iv) purification and manipulation of nucleic acids; v) expression and purification of proteins.

With the development of this project, it was possible to verify and conclude that at the level of human cell lines, CRISPr was a success both at the molecular and protein levels; there seems to be no influence on the total protein concentration with the cell stimulus; at the level of the co-location of Mob4 with the Golgi in Hct-11, this does not seem to exist; and unfortunately, we don't have inducible degradation of the Mob4 protein. During the work carried out on Zebrafish, it was possible to isolate 11 F1 carrier animals.

With this, it is necessary to determine why Mob4-AID-GFP in CRAL1 does not have auxin-induced degradation and cross the carrier animals with each other, in order to generate the homozygous null mutant, and observe its phenotype.



# Índice

|   |    |
|---|----|
| Agradecimentos .....  | 7  |
| .....   | 8  |
| .....   | 9  |
| .....   | 11 |
| Índice de Figuras .....   | 14 |
| Índice de Tabelas .....   | 19 |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....                                     | 21 |
| 1.Introdução .....  | 26 |
| 1.1    Ciclo celular .....                                      | 26 |
| 1.1.1    Mitose .....   | 27 |
| 1.2    Estruturas mitóticas .....                               | 28 |
| 1.2.1    Microtúbulos e Centrossomas.....                       | 28 |
| 1.3    Ciclo celular e cancro .....                             | 30 |
| 1.4    Família das proteínas MOB .....                          | 31 |
| 1.4.1    Mob1.....  | 32 |
| 1.4.2    A proteína hsMob4/phocein huamana .....                | 33 |
| 1.5    Complexo STRIPAK .....                                   | 35 |
| 1.6    Via de Sinalização Hippo .....                           | 41 |
| 1.6.1    Regulação da via Hippo por STRIPAK.....                | 45 |
| 1.7    Ferramentas de edição genética .....                     | 47 |
| 1.7.1    CRISPR/Cas9 em células humanas .....                   | 51 |
| 1.7.2    CRISPR/Cas9 em zebrafish para o knockout do gene ..... | 54 |
| 1.8 <i>Zebrafish</i> (Dario Rerio) como modelo animal .....     | 55 |
| 1.9    Resultados anteriores que motivam este estudo.....       | 56 |
| 1.9.1    Resultados prévios em células humanas .....            | 56 |
| 1.9.2    Resultados prévios em <i>Zebrafish</i> .....           | 60 |
| 1.10    Objetivos .....   | 62 |
| 2. Metodologia .....  | 63 |
| 2.1    Linhas celulares .....                                   | 63 |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.2      | Cultura de Células .....   | 63        |
| 2.3      | Congelamento das células .....   | 64        |
| 2.4      | Descongelamento das células .....  | 65        |
| 2.5      | Contagem de células .....  | 66        |
| 2.6      | Imunofluorescência das células .....   | 67        |
| 2.6.1    | Método de fixação com Formaldeído 3.7% .....   | 67        |
| 2.6.2    | Permeabilização, bloqueio, incubação de anticorpos e montagem dos slides<br>67                               |           |
| 2.7      | Eletroforese em gel de poliacrilamida e <i>Western Blotting</i> .....  | 69        |
| 2.7.1    | Preparação de lisados proteicos celulares .....  | 69        |
| 2.7.2    | SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) .....  | 70        |
| 2.7.3    | Géis corados com Coomassie Blue .....  | 71        |
| 2.7.4    | Western Blot .....   | 71        |
| 2.8      | Extração de DNA .....  | 73        |
| 2.8.1    | <i>Zebrafish</i> .....   | 73        |
| 2.8.2    | Células Humanas .....  | 73        |
| 2.9      | PCR (Polymerase Chain Reaction) .....  | 74        |
| <b>3</b> | <b>Resultados em células humanas</b>   | <b>76</b> |
| 3.1      | Curva de morte para a linha celular hTERT-RPE1 e Hela.....   | 78        |
| 3.2      | Sequenciação da linha estável CRAL1 indutível .....  | 80        |
| 3.3      | Verificação presença de GFP na linha celular CRAL1 por Western-Blot .....                                    | 80        |
| 3.4      | Verificação da influência da confluência celular nos níveis intracelulares da<br>proteína MOB4/phocein ..... | 81        |
| 3.5      | Indução da degradação da proteína Mob4/phocein por Doxiciclina e Auxina ....                                 | 83        |
| 3.6      | Tratamento da linha celular CRAL1 com a droga Brefaldina A .....   | 84        |
| <b>4</b> | <b>Resultados <i>Zebrafish</i></b>   | <b>87</b> |
| 4.1      | Rastreio de Heterozigóticos na geração F0 .....  | 88        |
| 4.2      | Análise dos resultados de Sequenciação dos Carriers F0 selecionados. ....                                    | 90        |
| 4.3      | Rastreio de Heterozigóticos na geração F1 .....  | 91        |
| <b>5</b> | <b>Discussão e conclusão</b>   | <b>94</b> |
|          | <b>Bibliografia</b>  | <b>97</b> |

|                        |     |
|------------------------|-----|
| <b>7. Anexos</b> ..... | 115 |
|------------------------|-----|

# Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1. 1 - Representação esquemática do ciclo celular</b> (G1,S,G2,M) e fases da mitose (prófase, metafase, anafase, telófase e citocinese).....  | 27 |
| <b>Figura 1. 2- Hallmarks do cancro</b> , adaptado de Hanahan D. e Weinberg R., “The Hallmarks of cancer”, Cell, 2011 (Hanahan & Weinberg, 2011).....   | 31 |
| <b>Figura 1. 3- Analisando a árvore filogenética</b> , podemos dividir a superfamília da proteína Mob-like em 4 grupos (Mob1, Mob2, Mob3 e Mob4). O gene que pretendemos estudar, Mob4, parece ter sido o primeiro a divergir da família.....   | 32 |
| <b>Figura 1. 4- Componentes principais do complexo STRIPAK em células de mamíferos.</b> Na figura são mostrados dois esquemas distintos que ilustram a composição do STRIPAK e as interações proteicas neste. É possível ver a striatin como o componente central do complexo, que interage diretamente com as proteínas PP2A (subunidades catalítica e de ancoragem), CCM3, STRIP1/2 e a Mob4 (no esquema da esquerda representada como Mob3, nome anteriormente atribuído à Mob4/phocein). A proteína CCM3 (também denominada de PDCD10, ilustração à direita) estabelece a ligação entre a striatin e as proteínas GCKIII. Estes componentes interagem, alternativamente, com os adaptadores tipo CTTNBP2 ou com as proteínas SLMAP e SIKE, formando os complexos 1 e 2, respetivamente (como ilustrado à direita da figura). Imagem adaptada de Hwang and Pallas (2014) (à esquerda) e retirada de Xie et al (2020) (à direita). .. | 38 |
| <b>Figura 1. 5- Simplificação ilustrativa da via de sinalização das MAPK.</b> Esta via é constituída por diversas quinases: as MAPKKKs (representadas por Raf, na figura), as MAPKKs (representadas por MEK, na figura) e as MAPKs (ou ERK). Quando estimulada, esta via é ativa, o que resulta na fosforilação, em cascata, destas quinases. Como resultado final, são promovidos processos celulares como o crescimento e proliferação, entre outros, bem como a inibição da morte celular. O STRIPAK, através das proteínas GCKIII (nomeadamente, a MST4), e possivelmente outros dos seus componentes, promove a atividade destas quinases ao fosforilar as MAPKKKs, podendo conduzir, assim, à transformação celular e promoção de processos pró-tumorais. Imagem adaptada de Ashton-Beaucage et al (2014).....  | 39 |
| <b>Figura 1. 6- Comparação das vias Hippo (em <i>Drosophila melanogaster</i>) e MST1/2 (em mamíferos).</b> Esta via de sinalização é altamente conservada entre moscas e mamíferos, sendo que todas as proteínas centrais na sua cascata de sinalização são ortólogas nestes organismos. A via Hippo é, em humanos, constituída pelas proteínas MST1/2 (homólogas da Hippo, em <i>Drosophila melanogaster</i> ), SAV1 (homóloga da Salvador), LATS1/2 (homólogas da Warts), Mob1A/B (homólogas da Mats), YAP e TAZ (homólogas da Yorkie) e TEAD (homóloga da Scalloped). Imagem retirada de Taha et al (2018).....  | 41 |

**Figura 1. 7- A via Hippo e a sua regulação.** Quando não fosforilados o YAP e TAZ interagem com a família de proteínas TEAD e outros fatores de transcrição, no núcleo. No entanto, YAP/TAZ são regulados negativamente de diversas formas: pelos componentes centrais da via Hippo, as quinases MST1/2 e LATS1/2, que o fosforilam; pelas proteínas Amot, que o sequestram nas junções de oclusão; e pelo complexo  $\alpha$ -catenina/14-3-3, que o fosforilam e inativam, nas junções aderentes. Para além da regulação do YAP/TAZ, a via Hippo pode ser regulada por outros mecanismos, tais como polaridade celular, sinalização através dos GPCRs (G protein–coupled receptors) e dos EGFRs (epidermal growth factor receptors) e mecanotransdução. Alterações na reorganização da actina (induzidas por Rho GTPases) são também um dos importantes mecanismos de regulação das LATS1/2; que, por sua vez, regulam a organização da actina no citoesqueleto (por meio das proteínas Amot). Nota: VGL4 é um co-repressor dos fatores de transcrição TEAD, que compete com as YAP/TAZ pela sua ligação. Imagem retirada de Yu et al

(2015). ..... 44

**Figura 1. 8- Regulação da via Hippo pelo STRIPAK.** (A) Modelo simplificado que demonstra a inibição da via Hippo pelo STRIPAK. A PP2A inibe a fosforilação das quinases MST e das MAP4Ks, permitindo a ativação da YAP/TAZ, no núcleo, o que leva à promoção de processos biológicos potencialmente tumorigénicos. (B) Modelo da regulação do antagonismo STRIPAK-SAV1, pela STK25. A proteína STK25 inativa a SAV1, através da sua fosforilação, o que permite à PP2A inibir a atividade das MST, levando à supressão da via Hippo. Aquando da presença de um estímulo, a SAV1 é libertada da inibição pela STK25 e reprime a PP2A, permitindo a fosforilação das MST, o que vai dar início à cascata de sinalização da via Hippo. Imagens

adaptadas de (A) Ardestani and Maedler (2020) e (B) Bae and Luo (2020). ..... 46

**Figura 1. 9 - Visão esquemática de técnicas de edição de genoma e mecanismos de reparo de DNA.** No canto superior esquerdo, há um mecanismo ZFN de edição de DNA por meio de FokI acoplado a duas guias de dedo de zinco, uma em cada cadeia de DNA genómico. No centro superior, há uma proteína Cas9 acoplada a um pequeno sgRNA, reconhecendo e ligando-se à sequência genómica alvo. Por outro lado, no canto superior direito está FokI acoplado a dois TALE que reconhecem a região no DNA. Todas as técnicas de edição de genoma permitem DNA DSB, reparado de forma imprecisa por meio de união de extremidades não homólogas levando à formação de indel. Se um modelo de DNA estiver disponível, ele também pode ser inserido na região de DNA quebrada por Reparo Direcionado por Homologia. (Adaptado de Li et al. 2016)

..... 49

**Figura 1. 10- Construção de mutantes de AID condicionais humanos.** (A) Uma ilustração esquemática do sistema AID. O OsTIR1 expresso pode formar um complexo SCFOsTIR1 E3 ligase funcional com os componentes endógenos em células humanas (Nishimura et al., 2009). Na presença de auxina, uma proteína de interesse fundida com mAID é rapidamente degradada após poli-ubiquitilação.(B) Uma ilustração esquemática que mostra a estratégia de construção de

mutantes AID condicionais humanos. Inicialmente, as células parentais devem ser geradas pela introdução de um transgene que codifica OsTIR1 no locus AAVS1 de porto seguro. Marcando os dois alelos de um gene alvo de interesse com mAID nas células parentais, mutantes condicionais de AID podem ser gerados..... 54

**Figura 1. 11- Representação esquemática do desenvolvimento embrionário do peixe-zebra.**  
56

**Figura 1. 12- Localização de Mob4 em células HeLa, em interfase (em cima) e em mitose (em baixo).** Em interfase, Mob4 apresenta-se localizada perinuclearmente, enquanto, que em mitose aparenta estar localizada em dois agregados, nos polos do fuso. Azul-DNA, vermelho- $\alpha$ -tubulina, verde-Mob4. Cláudia Florindo, 2007, dados não publicados..... 57

**Figura 1. 13- Principais defeitos mitóticos causados pela depleção de Mob4 em células HeLa.** (A-B) Defeitos no alinhamento dos cromossomas mitóticos em metafase. (C-F) Defeitos mais frequentes no fuso mitótico em células depletadas de Mob4, tais como (D) colapso do fuso, (E) fuso malformado e (F) fuso não centrado no plano celular; (C) Célula controlo, não depletada de Mob4, sem defeitos no fuso mitótico. Azul-DNA, verde-  $\alpha$ -tubulina, vermelho-  $\gamma$ -tubulina. Cláudia Florindo, 2007, dados não publicados. .... 59

**Figura 1. 14- Exemplo das medições efetuadas, nos embriões 24h após depleção do MOB4**  
..... 60

**Figura 2. 1- Esquema da câmara de Neubauer.** ..... 66

**Figura 2. 2 - Representação esquemática da montagem da cassete de transferência** pela seguinte ordem: esponja, três folhas de papel Whatman 3 MM, gel, membrana, três folhas de papel Whatman 3 MM e a esponja. Por fim coloca-se a cassete no tanque em que membrana é orientada mais próxima do eletrodo positivo enquanto o gel está situado na direção do eletrodo negativo, desta forma as proteínas carregadas negativamente migrarão para fora do gel e para a membrana#A-11034 ..... 69

**Figura 3. 1- Esquema do procedimento efetuado na produção de um mutante em linhas celulares humanas, com recurso a CRISPr.** ..... 76

**Figura 3. 2- Estratégia de inserção usada, de forma a inserir a cassete de interesse, no último codão codificante da proteína MOB4/phocein.** ..... 77

**Figura 3. 3- A- Curva de Morte para a linha celular hTERT-RPE1, com o antibiótico G418 e Hygromicina. B- Curva de Morte para a linha celular hTERT-RPE1, com o antibiótico Puromycin. C - Curva de Morte para a linha celular Hela, com o antibiótico G418. D- Curva de Morte para a linha celular Hela, com o antibiótico Hygromycin. E- Curva de Morte para a linha celular Hela, com o antibiótico Puromycin.** ..... 79

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 3. 4- Análise por Western-Blot da proteína de fusão com GFP resultante.</b> A- Marcação com anticorpo anti-GFP. B- Marcação com o anticorpo anti-actina .....  | 81  |
| <b>Figura 3. 5- Fotos retiradas ao microscópio da linha celular CRAL1, para as diferentes confluências.</b> A- 100% confluência, B- 30% confluência e C- 10% confluência.....  | 82  |
| <b>Figura 3. 6- Resultado da análise por western-blot dos pellet's correspondentes às diferentes confluências.</b> A- Marcação com o anticorpo 16E2 (1:1000), que marca a proteína MOB4/phocein. B- Marcação com o anticorpo GTU88 (1:1000), que marca a proteína $\gamma$ -tubulina   | 83  |
| <b>Figura 3. 7- Resultado da análise por western-blot da indução da degradação da proteína Mob4/phocein por Doxíciclina e Auxina.</b> A- Marcação com o anticorpo 16E2 (1:1000), que marca a proteína MOB4/phocein. B- Marcação com o anticorpo GTU88 (1:1000), que marca a proteína $\gamma$ -tubulina.....   | 84  |
| <b>Figura 3. 8- Imunofluorescência resultante do tratamento da linha CRAL1 com BFA.</b> A- Controlo, sem adição de BFA. B- Adição de BFA a 5 $\mu$ g /ml, durante 1 minuto. C- Adição de BFA a 5 $\mu$ g /ml, durante 2 minutos. D- Adição de BFA a 5 $\mu$ g /ml, durante 6 minutos. E- Adição de BFA a 5 $\mu$ g /ml, durante 10 minutos.....      | 86  |
| <br>   |     |
| <b>Figura 4. 1 - Esquema do procedimento efetuado no âmbito da produção de um mutante nulo vertebrado para a proteína MOB4/phocein.</b> * significa a repetição do procedimento. ..  | 87  |
| <b>Figura 4. 2- Produto de PCR, de toda a geração F0, corrido em gel de agarose a 3,5%.</b> Os peixe-zebra com * são os selecionados como carriers, após a análise por sequenciação (5.2.2).   | 90  |
| <b>Figura 4. 3- Produto de PCR dos embriões</b> resultantes do cruzamento dos 5 carriers com WT, 24 horas após.....  | 91  |
| <b>Figura 4. 4- Produto de PCR da descendência resultante do cruzamento dos carrier 25 com WT e do carrier 26 com WT.</b> .....  | 92  |
| <b>Figura 4. 5- Produto de PCR da descendência resultante do cruzamento dos carrier 22 com WT.</b> .....   | 92  |
| <b>Figura 4. 6- Produto de PCR da descendência resultante do cruzamento dos carrier 28 com WT</b> .....  | 92  |
| <br>   |     |
| <b>Figura 7. 1- Plasmídeo AIO-mCherry. Plasmídeo-base para a construção do pAL135,</b> por Álvaro Tavares. Este plasmídeo contém o sgRNA para o gene-alvo e a sequência para a enzima Cas9, constituindo o sistema CRISPR/Cas9. Imagem retirada de <a href="https://www.addgene.org/">https://www.addgene.org/</a> , consultado a julho de 2021..... | 115 |



# Índice de Tabelas

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabela 2. 1- Linhas celulares usadas ao longo do trabalho .....</b>   | <b>64</b> |
| <b>Tabela 2. 2- Lista de Anticorpos usados ao longo do trabalho .....</b>  | <b>68</b> |
| <b>Tabela 2. 3- Lista de Anticorpos secundários usados ao longo do trabalho .....</b>  | <b>69</b> |
| <b>Tabela 2. 4- Anticorpos primários usados em Western-Blot. ....</b>  | <b>72</b> |
| <b>Tabela 2. 5- Anticorpos secundários usados em Western-Blot. ....</b>  | <b>73</b> |
| <b>Tabela 2. 6- Listagem dos reagentes usados na Mix de PCR, com as respectivas quantidades para Zebrafish e células humanas .....</b>                                     | <b>75</b> |
| <b>Tabela 2. 7- Programa dos ciclos usados, para a amplificação do gene MOB4 por PCR, para Zebrafish e células humanas, respetivamente .....</b>                           | <b>75</b> |
| <br>   |           |
| <b>Tabela 3. 1- Programa dos ciclos usados, para a amplificação do gene MOB4 por PCR, para Zebrafish e células humanas, respetivamente .....</b>                           | <b>77</b> |
| <br>   |           |
| <b>Tabela 4. 1 Discriminação da geração F0, com o ID atribuído a cada peixe-zebra, o seu sexo, e o respetivo resultado após a seleção e análise por sequenciação. ....</b> | <b>89</b> |
| <b>Tabela 4. 2- Seleção final dos carriers F1, resultantes do cruzamento dos carriers F0 com WT.....</b>   | <b>93</b> |



# LISTA DE ABREVIATURAS

## A

AID system – do inglês, Auxin Inducible Degron system

AP-1 – do inglês, Adaptor Protein 1, também nomeada de clathrin adaptor protein

Arf1 – do inglês, ADP-Ribosylation Factor 1

## C

CCM3 – do inglês, Cerebral Cavernous Malformation 3, também nomeada de PDCD10

CDKs – do inglês, Cyclin-Dependent Kinases CENP – do inglês, Centromere Protein

CRISPR/Cas9 system – do inglês, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-Associated Protein 9 system

CTTNBP2-like – do inglês, Cortactin-Binding Protein 2-like

## D

dMob – do inglês, Drosophila Mps One Binder

proteins DNA – do inglês, Deoxyribonucleic Acid

## E

EGFR – do inglês, Epidermal Growth Factor Receptor

ERK 1/2 – do inglês, Extracellular-Signal-Regulated Kinase

## F

Frmd6 – do inglês, FERM Domain-containing protein 6

## G

GCK III – do inglês, Germinal Centre Kinase III

GFP – do inglês, Green Fluorescent Protein

GPCR – do inglês, G-Protein-Coupled Receptors

## **H**

hMob – do inglês, Human Mps One Binder proteins

hTERT RPE-1 – do inglês, Human Telomerase Reverse Transcriptase immortalized Retinal Pigment Epithelial cell line 1

## **I**

iRNA – do inglês, RNA interference

## **L**

LATS 1/2 – do inglês, Large Tumor Suppressor Kinase 1 and 2

## **M**

MAP4K – do inglês, Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase

Kinase MAPK – do inglês, Mitogen-Activated Protein Kinase

MAPKK – do inglês, Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase MAPKKK

– do inglês, Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase MATS – do inglês, Mob As Tumor Suppressor, também nomeada de dMob1

MST 1/2/3/4 – do inglês, Mammalian Sterile20-like proteins 1, 2, 3 and 4, também nomeadas de STK4, STK3, STK24 e STK26, respectivamente

## **N**

NDR 1/2 – do inglês, Nuclear Dbf2-Related kinases

Nf2 – do inglês, Neurofibromatosis 2

NHEJ – do inglês, Non-Homologous End Joining

## **P**

PAM – do inglês, Protospacer Adjacent Motif

PCR – do inglês, Polymerase Chain Reaction

PDCD10 – do inglês, Programmed Cell Death protein 10, também nomeada de

CCM3 PP2A – do inglês, Protein Phosphatase 2A

## **R**

RAD 50 – referente a, do inglês, RAD50 Double Strand Break Repair Protein

Raf – referente a, do inglês, RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase

RFP – do inglês, Red Fluorescent Protein RNA – do inglês, Ribonucleic Acid

## **S**

SAC – do inglês, Spindle Assembly Checkpoint

SAV 1 – proteína humana homóloga 1 à proteína Salvador

SCF complex – do inglês, Skp, Cullin, F-box containing complex

SG2NA – do inglês, cell cycle S/G2 Nuclear Autoantigen, também nomeada de STRN3

SIKE – do inglês, Suppressor of IKK-ε

SLMAP – do inglês, Sarcolemmal Membrane-Associated Protein

STK 24/25/26 – do inglês, Serine/Threonine Protein Kinase 24, 25 and 26, também nomeadas de MST 3, quinase de resposta ao stress oxidativo 1 e MST 4, respetivamente

STRIP 1/2 – do inglês, Striatin-Interacting Protein 1 and 2

STRIPAK complex – do inglês, Striatin-Interacting Phosphatase And Kinase

STRN3 – do inglês, Striatin 3, também nomeada de SG2NA

## **T**

TAZ – do inglês, Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif

TEAD – do inglês, Transcriptional Enhanced Associate Domain

TIR1/OsTIR1 – do inglês, Transport Inhibitor Response 1 protein, Os refere-se à planta *Oryza sativa*, do qual esta proteína pode ser obtida

## **V**

VGL4 – do inglês, Vestigial Like Family Member 4

## **Y**

YAP – do inglês, Yes-associated Protein



## 1. Introdução

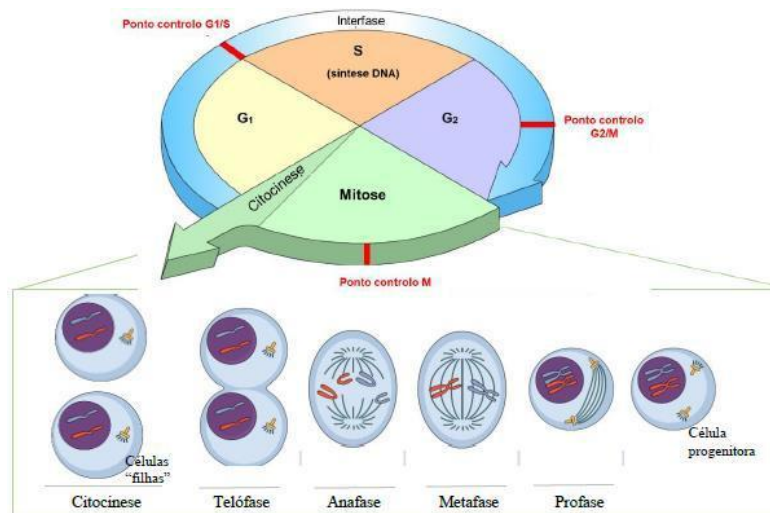
### 1.1 Ciclo celular

O ciclo celular é um processo importante e essencial para a sobrevivência e desenvolvimento de todos os organismos eucariotas (Giotti et al., 2017), e o controle da divisão celular afeta várias aspectos no desenvolvimento (van den Heuvel, 2005). Desta forma, a regulação deste processo é a chave para manter a homeostase e o balanço entre a proliferação e a morte celular. Quando ocorre uma falha neste controle do ciclo, variadas doenças podem ocorrer, nomeadamente, tumores (Duffy et al., 2005).

O ciclo celular pode dividir-se globalmente em duas fases, a Interfase e Mitose. A Interfase divide-se depois em 3 fases, G1, S e G2, fases estas essenciais para o crescimento e replicação, que são necessárias para que ocorra o processo de duplicação do DNA (do inglês, deoxyribonucleic acid) e divisão celular. A Mitose inclui a divisão celular mitótica, que gera duas células filhas idênticas (Casem, 2016; Faust et al., 2012; Sandal, 2002) (Figura 1.1). A fase G1 é a mais variável em termos de duração. Em mamíferos esta fase pode durar desde algumas horas a vários meses, podendo entrar na fase chamada G0, fase esta onde não há síntese de proteína e RNA. Na fase S dá-se a síntese de DNA (replicação do DNA), assim como de proteínas e RNA. Por fim, na fase G2, não há síntese de DNA, apenas se mantém a síntese de RNA e proteínas. Nesta fase a célula armazena energias e reúne as condições necessárias para a realização da mitose. A fase M é caracterizada pelo início da mitose, onde ocorre a divisão celular, originando duas células-filhas geneticamente idênticas. Durante este período a síntese de DNA é inexistente, e tanto a síntese de proteínas como a síntese de RNA é reduzida ao mínimo. (Baserga, 1965; IL & RC, 1963). A fase mitótica é dividida em cinco sub-fases: prófase, prometáfase, metafase, anáfase e telófase (Figura 1.1). Por fim, temos a realização da citocinese, que é um processo distinto da mitose, que tem como objetivo a divisão do citoplasma pelas duas células-filhas. Para tal, é realizado a formação de um anel contrátil, composto por filamentos de actina, na placa metafásica, aquando da anáfase (Barr & Gruneberg, 2007; Burkard et al., 2009).

A progressão através de cada fase do ciclo celular envolve uma interação complexa entre ciclinas, cinases dependentes de ciclina (CDK) e outros reguladores do ciclo celular (Duffy et al., 2005). Os reguladores do ciclo celular desempenham um papel crucial no desenvolvimento, crescimento, reparação e processos homeostáticos (Budirahardja &

Gönczy, 2009; F. Zheng et al., 2008). Assim, a caracterização das redes transcricionais envolvidas na progressão do ciclo celular pode contribuir para o tratamento de algumas doenças (Budirahardja & Gönczy, 2009).



**Figura 1. 1 – Ilustração esquemática simplificada representativa do ciclo celular (interfase e mitose) numa célula animal.** A interfase composta pelas fases G1, S e G2, sendo neste período que a célula prepara as reservas de energia e toda a maquinaria necessárias para a repartição equitativa do material celular pelas duas células-filhas, já em mitose. A mitose é constituída por cinco fases: prófase, prometáfase, metafase, anafase e telófase. Em prófase dá-se a condensação dos cromossomas e o início da migração dos dois centrossomas para os polos do fuso. Em prometáfase observa-se a fragmentação do envelope nuclear e a ligação dos microtúbulos aos cinetocoros dos cromatídios-irmãos, para que em metafase estes se possam alinhar corretamente na placa metafásica equatorial. Em anafase ocorre a segregação dos cromatídios-irmãos para os polos opostos do fuso e o alongamento do fuso mitótico devido ao movimento dos três tipos de microtúbulos (dos cinetocoros, interpolares e astrais). Por fim, em telófase, os cromatídios atingem os polos e começam a descondensar, os microtúbulos despolimerizam e os envelopes nucleares são formados. Depois da mitose, a célula termina a divisão celular ao realizar a citocinese, que permite a separação do citoplasma e dos componentes citoplasmáticos pelas duas células-filhas. A separação física das duas células-filhas é feita através de um a anel de constrição contráctil de actina que cliva a membrana citoplasmática e permite a abscisão das células. Imagem adaptada de <https://socratic.org/questions/what-conditions-need-to-be-met-in-order-for-a-cell-to-pass-the-critical-checkpoi>

### 1.1.1 Mitose

A mitose (do termo grego *Mitos*=filamentos) é um fenómeno celular em que uma célula divide o DNA replicado na fase S de igual modo pelas duas células filhas, originando duas células filhas geneticamente idênticas com o mesmo número de

cromossomas, perpetuando o genoma celular ao longo das gerações. A mitose é compreendida por cinco fases distintas, a prófase, prometáfase, metáfase, anafase e telófase (Figura 1.1). Em cada uma destas fases acontece um conjunto complexo de fenómenos celulares: na primeira fase da mitose, a prófase, dá-se o início da condensação dos cromossomas, processo este que se estende até à metáfase, onde estes atingem o seu estado de condensação máxima. Durante esta fase, o fuso mitótico inicia a sua formação, devido à migração dos dois centrossomas para os polos opostos deste. A fragmentação do envelope nuclear marca a entrada em prometáfase, permitindo assim o acesso dos microtúbulos aos cromossomas, resultando no movimento dos cromossomas para a zona equatorial da célula. À medida que esta fase avança, dá-se a ligação dos microtúbulos aos cinetocoros de cada cromossoma. De seguida, entramos na metáfase, onde os cromossomas se encontram no seu estado mais compactado, e se alinham no plano equatorial do fuso mitótico. Apenas quando todos os cromossomas estão alinhados corretamente, com orientação bipolar, o fuso corretamente montado e a ligação microtúbulo-cinetocoros corretamente estabelecida, a célula pode então avançar para a próxima fase, a anafase, onde ocorre a segregação dos cromátídios-irmãos. Na anafase, por fim, ocorre a separação dos cromátídios-irmãos, que são puxados pelos microtúbulos em direção aos polos opostos do fuso. Uma vez, finalizado este processo, temos a última fase, a telófase, em que os cromossomas atingem os polos do fuso, e o DNA inicia a descondensação, de forma semelhante dá-se a despolimerização dos microtúbulos e o fuso mitótico é desfeito. A telófase é seguida da citocinese, a última fase da divisão celular, em que o objetivo é a divisão completa do citoplasma pelas duas células-filhas, e conseqüente abscisão.

## **1.2 Estruturas mitóticas**

### **1.2.1 Microtúbulos e Centrossomas**

O centrossoma é um dos principais elementos do citoesqueleto e assume um papel crucial na orquestração do rearranjo do citoesqueleto. Regula a motilidade celular, adesão e polaridade, na interfase e especialmente durante a divisão celular, o centrossoma é determinante na configuração do fuso mitótico que eventualmente segregará os cromossomas em células-filhas (Bettencourt-Dias & Glover, 2007; Glover et al., 1993).

Os centrossomos são compostos por dois centríolos circundados por uma matriz elétron-densa, o material pericentriolar (PCM). Cada centríolo é um feixe cilíndrico de nove hastes e cada haste é composta por três microtúbulos (MTs), fundidos ao longo de seu comprimento (Glover et al., 1993). Cada microtúbulo resulta da montagem de 13 proto filamentos, que são polímeros, compostos pelas subunidades da tubulina  $\alpha$  e  $\beta$ . Os centríolos também fornecem o corpo basal necessário para a formação dos flagelos e cílios. Juntos, os centrossomas formam o principal centro organizador de microtúbulos (MTOC) das células animais, regulando a nucleação e a organização espacial dos MTs. Nas células em interfase, uma extensa gama de microtúbulos emana do centrossoma e se distribui por todo o citoplasma, transportando organelas e vesículas. Enquanto na mitose, esse arranjo de fibras é desmontado e os monômeros de tubulina assumem uma estrutura completamente diferente, o fuso mitótico bipolar (Glover et al., 1993). Essa transição entre o crescimento e o encolhimento é altamente dinâmica e causada por um fenômeno denominado instabilidade dinâmica (Glover et al., 1993). Na maioria das espécies, a nucleação de microtúbulos requer  $\gamma$ -tubulina que está presente no PCM e, juntamente com vários outros fatores, forma um modelo de nucleação estável a partir do qual os MTs começam a polimerizar (Gergely, 2002).

Mudanças na dinâmica dos microtúbulos estão diretamente associadas à progressão do ciclo celular. Além disso, para que as células-filhas herdem um centrossoma, essa estrutura precisa se duplicar apenas uma vez por ciclo celular (Bettencourt-Dias & Glover, 2007). Um pro centríolo se reúne ortogonalmente a cada centríolo existente durante a fase S e se alonga em aproximadamente 80% de seu comprimento no momento da mitose. A maturação restante ocorre apenas durante o ciclo celular seguinte (Gönczy, 2012). Se um centrossoma não se replicar, um fuso bipolar não pode ser formado e as células não são capazes de se dividir. Por outro lado, se os centrossomas continuarem se replicando, a formação de fusos multipolares resultará na segregação deficiente dos cromossomos (Glover et al., 1993). Evidentemente, os números do centrossoma devem ser rigidamente controlados e a biogênese do centrossoma e o ciclo celular devem ser coordenados (Bettencourt-Dias & Glover, 2007). Problemas nessa coordenação entre os dois ciclos e na organização do polo fuso ocorrem em muitos cânceros e podem estar associados à instabilidade genômica (Bettencourt-Dias & Glover, 2007). No entanto, apesar do progresso recente, ainda existem várias questões em aberto

sobre como a amplificação do centrossoma afeta a tumor gênese (Godinho & Pellman, 2014)

### **1.3 Ciclo celular e cancro**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo. Um estudo revelou que houve 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes em 2012 (Ferlay et al., 2015). Infelizmente, esses números tendem a aumentar, tornando-se a principal causa de morbidade e mortalidade nas próximas décadas. Em 2030, são esperados 20,3 milhões de novos casos de cancro e mais de 13 milhões de mortes devido ao cancro (Bray et al., 2012).

A nível celular, o cancro é visto como um processo que envolve várias etapas, que levam a mutações e conseqüente seleção de células com aumento de proliferação, sobrevivência, invasão e capacidade metastática (Blanpain, 2013). Na maioria das vezes, estas mutações afetam oncogenes ou genes tumor-supressores. Desta forma, a nível fisiológico à um aumentos do número de células tumorais por meio da estimulação da proliferação ou da inibição da morte celular. Outra forma de ação, é pela inativação dos genes de estabilidade, levando a uma taxa de mutação mais elevada (Friedberg, 2003). Os genes de estabilidade incluem os genes de reparação de incompatibilidade (MMR), reparação de excisão de nucleotídeo (NER) e reparação de excisão de base (BER) e são responsáveis por reparar erros cometidos durante a replicação de DNA ou induzidos por exposição a agentes mutagénicos (Vogelstein & Kinzler, 2004).

As características do cancro descrevem as alterações genéticas mínimas necessárias para que uma célula normal deve sofrer para se transformar. Estes incluem a evasão de supressores de crescimento, sinalização proliferativa constitutiva, prevenção da apoptose (morte celular programada), capacidade de induzir angiogénese (formação de novos vasos sanguíneos), imortalidade replicativa e invasão/metástase ativadora, e foram descritas em 2000 por Hanahan and Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2011). Estas foram as seis “hallmarks” originais, no entanto, desde que foram descritas, quatro “hallmarks” adicionais foram incorporadas. Onze anos depois, em 2011, os mesmos autores atualizaram essa lista incluindo mais duas marcas essenciais para a transformação maligna: instabilidade genómica e inflamação. Além disso, existem mais duas

capacidades emergentes: a reprogramação metabólica e a prevenção do sistema imunológico, conforme mostrado na Figura 1.2 (Hanahan & Weinberg, 2011).



**Figura 1. 2- Hallmarks do cancro**, adaptado de Hanahan D. e Weinberg R., “The Hallmarks of cancer”, Cell, 2011 (Hanahan & Weinberg, 2011).

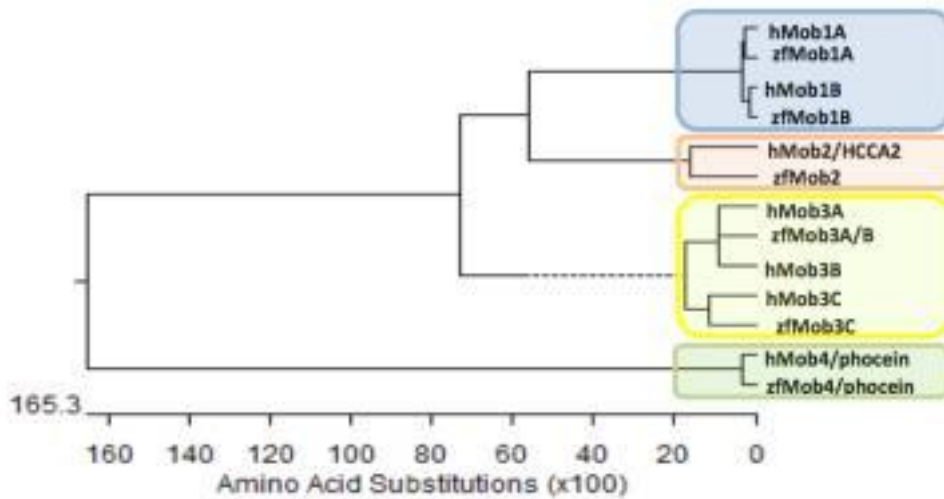
#### 1.4 Família das proteínas MOB

A família de proteínas Mob (monopolar spindle-one-binder proteins) foram, pela primeira vez, descritas em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), sendo descobertas duas proteínas Mob existentes neste organismo, Mps1 e Mps2 (Luca & Winey, 1998). Mps1 parece estar envolvida no controlo da saída da mitose, e Mps2 na regulação da morfogénese. Na Figura 1.3 podemos observar a árvore filogenética das família de Mobs.

Em humanos, a família de proteínas Mob é constituída por sete proteínas: hMob1A, hMob1B, hMob2, hMob3A, hMob3B, hMob3C e hMob4 (ou phocein), altamente conservadas na natureza. As Mob são proteínas globulares com cerca de 110 a 140 aminoácidos (aproximadamente, 26 kDa, em humanos, UniProt), de ancoragem (scaffold), não sendo conhecida nenhuma atividade enzimática por parte destas (Gundogdu & Hergovich, 2019).

Em *Drosophila melanogaster* estão descritas quatro proteínas Mob. dMob1, está envolvida na regulação da proliferação celular e morte celular. Foi observado, que a depleção desta proteína é letal para estes indivíduos. Temos ainda, dMob2, dMob3 e dMob4, como as restantes três proteínas Mob presentes neste organismo. Apesar de

aparentarem desempenhar algum papel no desenvolvimento morfogénico, mais especificamente, na regulação do desenvolvimento neuronal, estas proteínas não se encontram tao bem descritas como dMob1, e os seus mecanismos continuam por elucidar (Gundogdu & Hergovich, 2019).



**Figura 1. 3-** Analisando a árvore filogenética, podemos dividir a superfamília da proteína Mob-like em 4 grupos (Mob1, Mob2, Mob3 e Mob4). O gene que pretendemos estudar, Mob4, parece ter sido o primeiro a divergir da família.

### 1.4.1 Mob1

Dentro da família Mob, as proteínas hsMob1A e hsMob1B são as mais bem estudadas e caracterizadas. Estas proteínas, são, na sua maioria, proteínas citoplasmáticas, com uma função redundante. Mais especificamente, aparentam ter uma localização nos centrossomas e midbody, durante a prometáfase (Florindo, 2004). Aquando da depleção de Mob1 em células humanas, verificou-se um prolongamento da separação dos centríolos após a mitose, bem como a incapacidade das células de completarem a abscisão, falhando a citocinese, resultando, por vezes, em células binucleadas (Florindo, 2004). Já uma sobre-expressão desta proteína, resulta na falha da separação dos centrossomas, sugerindo que a Mob1 poderá estar envolvido na regulação centrossomal durante a mitose, na regulação da estabilidade dos microtúbulos e ser necessária para a realização da citocinese. (Florindo, 2004). As hsMob1 apresentam também a capacidade

de ativar as quinases NDR/LATS, aquando da sua ligação à membrana citoplasmática (Hergovich et al., 2005, 2006); . Mob1A pode também ligar-se diretamente às proteínas MST1/2 (proteínas homólogas, em humanos, à proteína Hippo, em *Drosophila melanogaster*), atuando como um componente principal na regulação da via Hippo (Gundogdu & Hergovich, 2019; Praskova et al., 2008; Wei et al., 2007).

Estudos em células humanas do cancro, demonstraram que a expressão de Mob1 apresenta-se diminuída em diversos tipos de cancro, nomeadamente em cancro do pulmão e do fígado, sendo que foi observado que ratinhos nulos para esta proteína são mais suscetíveis ao desenvolvimento deste tipo de tumores (Gundogdu & Hergovich, 2019).

#### **1.4.2 A proteína hsMob4/phocein huamana**

Em *Drosophila melanogaster*, a dMob4 é uma proteína reguladora da neurogénese, nomeadamente na regulação das ramificações neurais durante o desenvolvimento larvar, na regulação do transporte axonal e na formação de sinapses em moscas adultas (Schulte et al., 2010). Foi também observado que dMob4 está envolvida na organização dos microtúbulos durante a mitose (Trammell et al., 2008). Especula-se que as funcionalidades observadas de dMob4 possam relacionadas ao facto desta proteína poder estar envolvida no complexo STRIPAK, em *Drosophila melanogaster* (Gundogdu & Hergovich, 2019). A depleção desta proteína é letal para os estados larvares deste organismo (Schulte et al., 2010), no entanto este fenótipo pode ser recuperado pela introdução da Mob4 humana, revelando assim uma elevada conservação funcional desta proteína entre as duas espécies.

Já foi descrita uma ligação da hMob4 ao STRIPAK, sendo este um componente principal deste complexo (Bae et al., 2020; Gundogdu & Hergovich, 2019; J. Hwang & Pallas, 2014; Kück et al., 2019; Moreno et al., 2001; Seo et al., 2020; Shi et al., 2016; Xie et al., 2020). O complexo STRIPAK (Striatin-interacting phosphatase and kinase) é um complexo proteico composto por várias quinases e fosfatases, que regulam a fosforilação de diversas proteínas em vias de sinalização essenciais para a células, nomeadamente a via Hippo (Bae et al., 2020; Kück et al., 2019; Seo et al., 2020; Shi et al., 2016). A estrutura, função e relevo para este estudo do complexo STRIPAK e da via de sinalização Hippo vão ser discutidos em mais detalhe nos próximos subcapítulos deste trabalho. Apesar da ligação do STRIPAK à regulação da via Hippo estar já estabelecida, a função

particular da Mob4 neste mecanismo ou em qualquer outro processo associado ao complexo STRIPAK não está descrita.

Além disso, a Mob4 interage também com a MST4 (M. Chen et al., 2018; Gundogdu & Hergovich, 2019), proteína pertencente à família das proteínas MST1/2 e um dos componentes do complexo STRIPAK (Kück et al., 2019), interação esta que ocorre de uma forma dependente de fosforilação<sup>30</sup>. Foi proposto por Chen e colegas (2018) que este complexo MST4/hMob4 é estruturalmente semelhante ao complexo MST1/hMob1, podendo assim provocar a sua disrupção, por alternância de interação com as proteínas MST (M. Chen et al., 2018). No entanto, e mais uma vez, estas interações não estão ainda devidamente descritas.

Foi demonstrado por Baillat e colegas (2001) que a Mob4 e a SG2NA (ou STRN3, uma das três proteínas da família da striatin, componente principal do complexo STRIPAK) interagem e co-localizam no Golgi, em células humanas (Baillat et al., 2001). Foi demonstrado que a fração proteica de Mob4 presente no Golgi sofre dispersão citoplasmática após tratamento com Brefaldin A (substância química que impede o transporte de vesículas do retículo endoplasmático para o Golgi, promovendo assim a sua fragmentação). Este comportamento é semelhante ao observado em proteínas bem estabelecidas como reguladoras do transporte de vesículas para o Golgi, bem como proteínas necessárias para a montagem deste (tais como as proteínas AP-1 e Arf1) (Baillat et al., 2001), suportando assim um importante papel da Mob4 no transporte de vesículas membranares (Baillat et al., 2001; Bailly & Castets, 2007; Kück et al., 2019).

Foi observado que, aquando da depleção de Mob4, em células humanas, estas expressam fenótipos aberrantes durante mitose, nomeadamente defeitos no fuso mitótico (Gundogdu & Hergovich, 2019), entre os quais o colapso, a malformação ou a descentralização do fuso em relação à célula (Cláudia Florindo, dados não publicados), o que leva à paragem do ciclo celular e, posteriormente, morte celular. Estes dados demonstram que a Mob4 poderá ser uma proteína essencial para a progressão do ciclo celular, em mitose. Somando aos efeitos anormais causados na organização do fuso, foram também observados erros no alinhamento dos cromossomas na placa metafásica (Cláudia Florindo, dados não publicados), estes resultados são semelhantes aos obtidos aquando da depleção de proteínas do cinetocoros, tais como as proteínas CENP, sugerindo uma possível função da Mob4 nos cinetocoros durante mitose, mais precisamente na regulação da ligação cinetocoros-microtúbulos. Suportando ainda esta

hipótese, a localização da proteína CENP-A nos cinetocoros está alterada em células depletadas de Mob4. Em suma, dados previamente obtidos por colegas do laboratório, sugerem que a proteína Mob4 é necessária para a realização da mitose, bem como poderá ser uma das proteínas requeridas para a correta ligação cinetocoros-microtúbulos em células humanas.

Em estudos, realizados em linhas celulares tumorais humanas observou-se também que a depleção de Mob4 reduz, significativamente, a sobrevivência das células, em diversos tipos de tumores (Behan et al., 2019; Gundogdu & Hergovich, 2019). Estas observações estão em concordância com a sobre-expressão de Mob4 observada em diversos tumores, nos mais variados tecidos, desde o pâncreas (Gundogdu & Hergovich, 2019) à mama, sendo esta proteína já utilizada como um marcador de mau prognóstico em cânceros renais e do fígado (The Human Protein Atlas).

Resumidamente, muito é especulado acerca da função da Mob4 em diversos processos celulares, desde o transporte de vesículas, à regulação da mitose e ao seu envolvimento no desenvolvimento tumoral, no entanto poucas destas funções estão, de facto, estabelecidas e descritas. Sendo, um dos objetivos deste estudo, a confirmação e elucidação do envolvimento da Mob4 em alguns dos processos mencionados acima.

## **1.5 Complexo STRIPAK**

O complexo STRIPAK (Striatin-interacting phosphatase and kinase) é constituído por diversas proteínas, quinases e fosfatases, sem atividade enzimática e funciona como um complexo de suporte e ancoragem (scaffold) (J. Hwang & Pallas, 2014). Este complexo demonstra uma grande conservação evolucionária e está envolvido na regulação de uma elevada variedade de processos biológicos (Ardestani & Maedler, 2020; Bae et al., 2020; R. Chen et al., 2019; Guzzo et al., 2004; J. Hwang & Pallas, 2014; Kean et al., 2011; J. W. Kim et al., 2020; Kück et al., 2019; Moreno et al., 2001; Seo et al., 2020; Shi et al., 2016; Xie et al., 2020). Para além da Mob4 e da striatin, o STRIPAK é composto pelas proteínas PP2A, CCM3, proteínas da família GCKIII e pela STRIP1/2, tal como é possível observar na Figura 1.4. (Gundogdu & Hergovich, 2019; J. Hwang & Pallas, 2014; Kück et al., 2019; Shi et al., 2016). A família da striatin é composta por três proteínas: STRN, SG2NA (S/G2 nuclear antigen ou STRN3) e a zinedine (STRN4). A principal característica desta família é o facto de as proteínas apresentarem múltiplos

domínios para interações proteína-proteína, o que permite a formação de complexos proteicos robustos, contendo um elevado número de proteínas em interação simultaneamente (J. Hwang & Pallas, 2014; Moreno et al., 2001; Shi et al., 2016). PP2A (serine/threonine protein phosphatase 2) é uma proteína heterotrimérica composta por uma subunidade catalítica (PP2Ac), uma subunidade de ancoragem (PP2Aa) e uma subunidade regulatória (J. Hwang & Pallas, 2014). A subunidade de ancoragem medeia a interação entre a subunidade catalítica e as várias subunidades reguladoras, sendo que a striatin foi identificada uma destas unidades regulatórias, promovendo a atividade da PP2A na desfosforilação das suas proteínas alvo (J. Hwang & Pallas, 2014; J. W. Kim et al., 2020).

A família de quinases GCKIII (germinal centre kinase III) é composta por três proteínas: MST3 (ou STK24), MST4 (ou STK26) e STK25 (quinase de resposta ao stress oxidativo 1) (Gundogdu & Hergovich, 2019; J. W. Kim et al., 2020; Shi et al., 2016). Estas proteínas foram, previamente, implicadas em processos celulares como o crescimento, proliferação, migração, polaridade e apoptose celular, sendo que a interação com as fosfatases do complexo STRIPAK inibe a sua atividade (Shi et al., 2016).

CCM3 (cerebral cavernous malformation 3 ou PDCD10) foi, inicialmente, identificado como uma proteína associada à morte celular, sendo que mutações com perda de função desta proteína levam a lesões vasculares cavernosas cerebrais (razão da origem do seu nome) (Shi et al., 2016). A principal função das CCM3 no complexo STRIPAK é recrutar as proteínas GCKIII e estabelecer a sua ligação à striatin (Figura 1.4). Foi observado que esta interação CCM3/GCKIII promove o aumento da proliferação em células humanas, no entanto fora deste complexo, estas proteínas podem ter comportamentos diferentes, sugerindo que a sua função depende do contexto biológico em que estão inseridas (Kean et al., 2011; Shi et al., 2016).

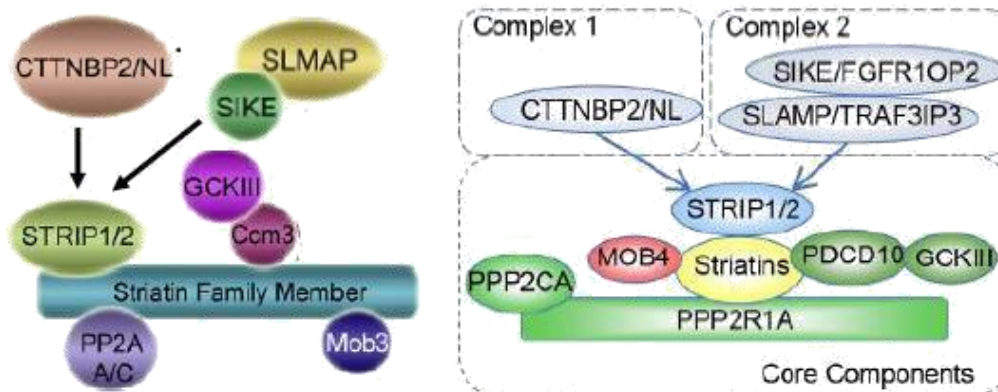
STRIP1 e 2 (striatin-interacting protein 1 and 2) regulam a organização do citoesqueleto e a morfologia celular, sendo fatores essenciais para a diferenciação e dinâmica celular, como apontado por estudos de depleção desta proteína (Goudreault et al., 2009; Shi et al., 2016). No entanto, esta proteína permanece muito pouco caracterizada, não estando descrito o seu papel no complexo STRIPAK, sabe-se apenas que estas proteínas interagem com a striatin (e por isso, tendo-se nomeado de tal forma) (Goudreault et al., 2009).

Estão descritos dois complexos STRIPAK distintos, baseados em parceiros de ligação alternativos, não fazendo, estes, parte do núcleo principal que constitui estes complexos. Os dois complexos são então adicionalmente constituídos pelos adaptadores tipo CTTNBP2 e pela SLMAP (sarcolemmal membrane-associated protein) e SIKE (suppressor of IKK- $\epsilon$ ), respetivamente, sendo estes dois complexos mutualmente exclusivos (Gundogdu & Hergovich, 2019; Xie et al., 2020). A Figura 1.4 ilustra os dois complexos STRIPAK alternativos com o seu núcleo comum e as proteínas alternativas adicionais, que foram acima descritas.

Uma vez revisto e sumariado o complexo STRIPAK de uma perspetiva estrutural, iremos agora passar a uma análise funcional deste complexo, elucidando quais as vias e processos celulares em que o seu envolvimento é conhecido e impactante.

De forma a sugerir possíveis funções do complexo STRIPAK, estudos de localização foram executados por vários autores, tendo destes estudos provindo resultados que mostram que a localização destes complexos depende dos componentes específicos que os integram no momento (Kück et al., 2019). Ou seja, dependendo das subunidades de striatin e STRIP, o STRIPAK pode ou não estar localizado no envelope nuclear e no Golgi, enquanto a presença de SLMAP no complexo vai preferencialmente conduzi-lo para as mitocôndrias e para o retículo endoplasmático. Para além da associação a diversas funções em cada um destes organelos, a observação do STRIPAK em outras estruturas como os centrossomas, leva à hipótese de que este complexo poderá funcionar como uma ponte de comunicação para facilitar a coordenação das estruturas mencionadas durante a divisão celular (Frost et al., 2012; Kück et al., 2019).

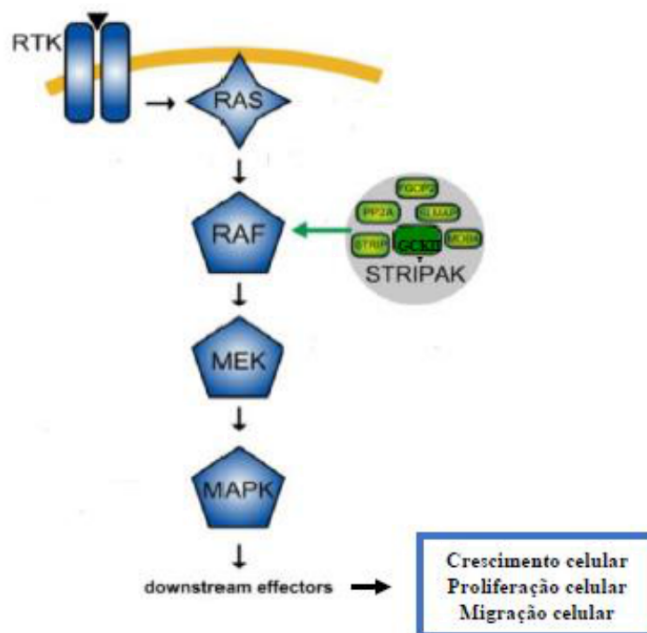
O STRIPAK tem sido associado com as mais diversas vias de sinalização e processos biológicos nas células, desde a proliferação celular à apoptose (J. Hwang & Pallas, 2014; J. W. Kim et al., 2020; Kück et al., 2019; Shi et al., 2016; Xie et al., 2020), à polaridade e migração celular (Kean et al., 2011; Kück et al., 2019; Shi et al., 2016), à regulação da montagem e fragmentação do Golgi (J. Hwang & Pallas, 2014), regulação do transporte vesicular e regulação do citoesqueleto (Guzzo et al., 2004; J. Hwang & Pallas, 2014; Kück et al., 2019), à angiogénese (J. Hwang & Pallas, 2014), neurogénese (J. Hwang & Pallas, 2014; Kück et al., 2019), e até à regulação da concentração de cálcio na células (J. Hwang & Pallas, 2014), entre outros processos celulares.



**Figura 1. 4- Componentes principais do complexo STRIPAK em células de mamíferos.** Na figura são mostrados dois esquemas distintos que ilustram a composição do STRIPAK e as interações proteicas neste. É possível ver a striatin como o componente central do complexo, que interage diretamente com as proteínas PP2A (subunidades catalítica e de ancoragem), CCM3, STRIP1/2 e a Mob4 (no esquema da esquerda representada como Mob3, nome anteriormente atribuído à Mob4/phocein). A proteína CCM3 (também denominada de PDCD10, ilustração à direita) estabelece a ligação entre a striatin e as proteínas GCKIII. Estes componentes interagem, alternativamente, com os adaptadores tipo CTTNBP2 ou com as proteínas SLMAP e SIKE, formando os complexos 1 e 2, respectivamente (como ilustrado à direita da figura). Imagem adaptada de Hwang and Pallas (2014) (à esquerda) e retirada de Xie et al (2020) (à direita).

Uma das vias de sinalização mais relevante que é regulada pelo STRIPAK é a via das MAPK (Figura 1.5), que está envolvida em diversos processos celulares e que responde, entre outros, a estímulos hormonais e a fatores de crescimento (Shi et al., 2016). Esta via é composta, na sua maioria, por quinases, que atuam em três níveis da cascata de sinalização, sendo estas quinases denominadas de MAPKs, MAPKKs (MAPK kinases) e MAPKKKs (MAPK kinase kinases). Proteínas GCKIII, componentes do STRIPAK, podem também ser chamadas de MAP4Ks, já que podem diretamente fosforilar e ativar as MAPKKKs. A MST4 (membro da família das GCKIII) pode promover a atividade da proteína Raf (MAPKKK), que por sua vez estimula a MEK1/2 (MAPKK) a ativar a ERK1/2 (MAPK), levando assim à promoção do crescimento, proliferação celular e invasão celular, bem como à inibição da morte celular (Ardestani & Maedler, 2020; Kück et al., 2019; Shi et al., 2016). Para além das GCKIII, outros membros do STRIPAK também foram identificados como reguladores desta via, tais como as striatins, as STRIP,

a SLMAP e a Mob4, visto que depleção de qualquer uma destas proteínas leva à redução da fosforilação de ERK1/2 e à consequente diminuição da atividade desta via de sinalização. Contudo, os mecanismos inerentes ao envolvimento destas proteínas nesta via não estão ainda descritos ou clarificados (Shi et al., 2016). Ainda assim, as descobertas feitas até ao momento, incluindo a interação descrita com a via das MAPK, parecem retratar as proteínas do STRIPAK como proteínas oncogénicas, nomeadamente a MST4, a Mob4 (devido à sua sobre-expressão em vários tumores, como visto anteriormente), a PP2A e as striatins (sendo estas duas últimas implicadas no desenvolvimento de leucemias) (J. Hwang & Pallas, 2014; Xie et al., 2020).



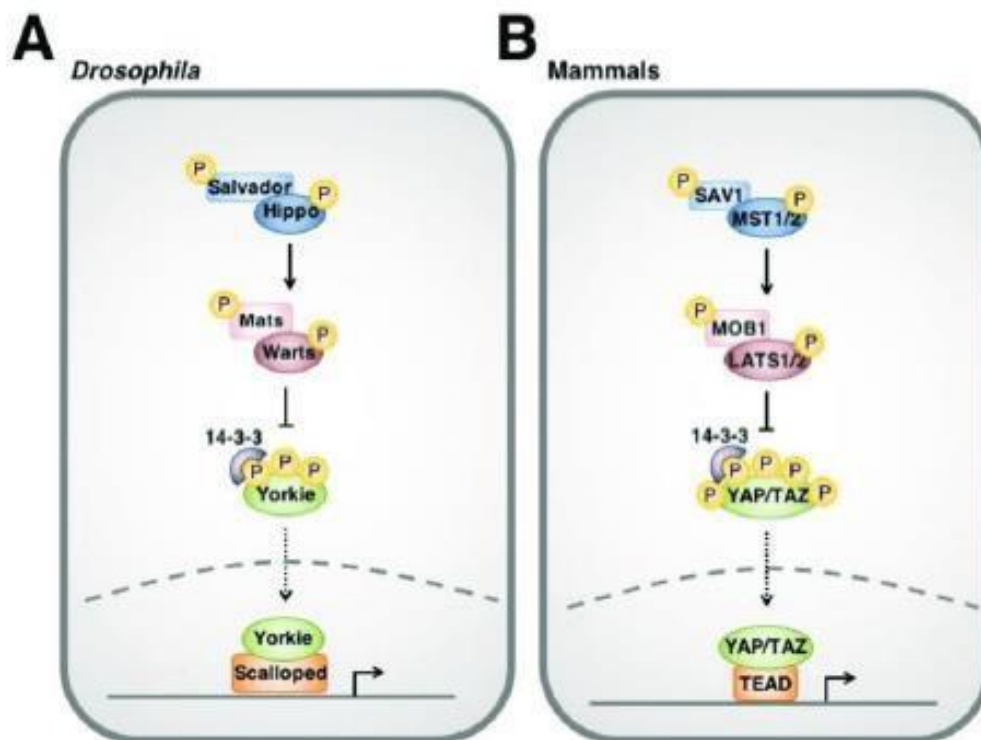
**Figura 1. 5- Simplificação ilustrativa da via de sinalização das MAPK.** Esta via é constituída por diversas quinases: as MAPKKKs (representadas por Raf, na figura), as MAPKKs (representadas por MEK, na figura) e as MAPKs (ou ERK). Quando estimulada, esta via é ativa, o que resulta na fosforilação, em cascata, destas quinases. Como resultado final, são promovidos processos celulares como o crescimento e proliferação, entre outros, bem como a inibição da morte celular. O STRIPAK, através das proteínas GCKIII (nomeadamente, a MST4), e possivelmente outros dos seus componentes, promove a atividade destas quinases ao fosforilar as MAPKKKs, podendo conduzir, assim, à transformação celular e promoção de processos pró-tumorais. Imagem adaptada de Ashton-Beaucage et al (2014).

A dinâmica do citoesqueleto é necessária não só para a correta morfologia celular, mas também para regulação da motilidade e da comunicação entre a célula e a matriz extracelular. Microtúbulos e filamentos de actina são dois dos principais elementos que constituem o citoesqueleto, sendo os primeiros necessários para a formação do fuso mitótico e para o desenvolvimento de cílios e flagelos, já os filamentos de actina são essenciais para suportar a forma das células, para a adesão celular e para a formação da lamellipodia e filopodia durante a migração celular. Entre os participantes na regulação da remodelação do citoesqueleto podemos encontrar o STRIPAK (Kück et al., 2019; Shi et al., 2016). Foi observado que a depleção de STRN e CTTNBP2 em células humanas conduz à instabilidade e despolimerização de microtúbulos, inibindo assim a divisão celular (Shi et al., 2016); isto sugere que estas duas proteínas se associam aos microtúbulos, aumentando a sua estabilidade. Já na regulação das fibras de actina e da migração celular participam membros diferentes do complexo. As MST3 e MST4 recrutam fatores que promovem a polimerização e contração de actina, possibilitando a associação destes à actina nas zonas de protrusão celular, que comandam a direção do movimento da célula (Kück et al., 2019; Shi et al., 2016). Esta associação vai permitir a montagem da maquinaria necessária para a migração da célula, incluindo em contexto tumoral, o que potencia a formação de metástases. MST3/4 regulam assim de uma forma positiva o processo de migração celular; em contrapartida, as striatins e a STRIP1 regulam este processo negativamente, ao inibirem a atividade das MST (Shi et al., 2016). Expressão elevada de MST3/4 e CCM3 (necessária para o recrutamento das MST) foi encontrada em amostras de cancro da mama, estando associada a fenótipos mais agressivos e a um mau prognóstico nestes pacientes (Shi et al., 2016; Xie et al., 2020).

Por fim, o STRIPAK participa na regulação de uma das mais importantes vias celulares, a via Hippo (em *Drosophila melanogaster*) ou via MST1/2 (em humanos). Dada a importância desta via, o papel do STRIPAK na sua regulação vai ser discutido no subcapítulo 1.6.1, depois de uma sucinta introdução à estrutura e função da Hippo, em humanos.

## 1.6 Via de Sinalização Hippo

A via Hippo é uma via de sinalização altamente conservada na natureza; foi pela primeira vez descrita em *Drosophila melanogaster*, sendo que mais tarde foram encontrados homólogos em humanos para todos os seus principais componentes (Figura 1.6). A via Hippo é o principal regulador no controlo do tamanho dos órgãos e na homeostase e regeneração de tecidos, principalmente durante o desenvolvimento destes. Para tal, esta via tem um papel central no controlo de processos como o crescimento, proliferação, diferenciação, morte, migração e organização estrutural e morfológica celular (Harvey et al., 2013; Hauri et al., 2013; Maugeri-Saccà & De Maria, 2018; Meng et al., 2016; Pan, 2010; Taha et al., 2018; F. X. Yu, Zhao, et al., 2015).



**Figura 1. 6- Comparação das vias Hippo (em *Drosophila melanogaster*) e MST1/2 (em mamíferos).** Esta via de sinalização é altamente conservada entre moscas e mamíferos, sendo que todas as proteínas centrais na sua cascata de sinalização são ortólogas nestes organismos. A via Hippo é, em humanos, constituída pelas proteínas MST1/2 (homóloga da Hippo, em *Drosophila melanogaster*), SAV1 (homóloga da Salvador), LATS1/2 (homólogas da Warts), Mob1A/B (homólogas da Mats), YAP e TAZ (homólogas da Yorkie) e TEAD (homóloga da Scalloped). Imagem retirada de Taha et al (2018).

O núcleo da via Hippo é formado por várias quinases, entre as quais as proteínas MST1/2, LATS1/2 (large tumor suppressor 1 and 2), YAP (Yes-associated protein) e TAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif) e a TEAD (transcriptional enhanced associate domain), sendo que as proteínas MST1/2 e LATS1/2 se encontram associadas com as proteínas adaptadoras SAV1 (Salvador homologue 1) e Mob1A/B, respetivamente, tal como é mostrado na Figura 1.6. (Frost et al., 2012; Harvey et al., 2013; Pan, 2010; Taha et al., 2018). O complexo MST/SAV1 limita a atividade das proteínas YAP e TAZ, através da indução da sua fosforilação, diretamente, pelo complexo LATS/Mob1. Esta fosforilação vai permitir a criação de sítios de ligação à 14-3-3 (Figura 1.6), o que leva à acumulação de YAP e TAZ no citoplasma ou à sua degradação por ubiquitinação, impedindo a sua translocação para o núcleo e a ativação de fatores de transcrição como as TEAD. Estes fatores de transcrição ativam genes envolvidos no crescimento, proliferação e diferenciação, estando a via Hipo a inibi-los, deste modo regulando a homeostase e tamanho dos tecidos (Harvey et al., 2013; Pan, 2010; F. X. Yu, Zhao, et al., 2015).

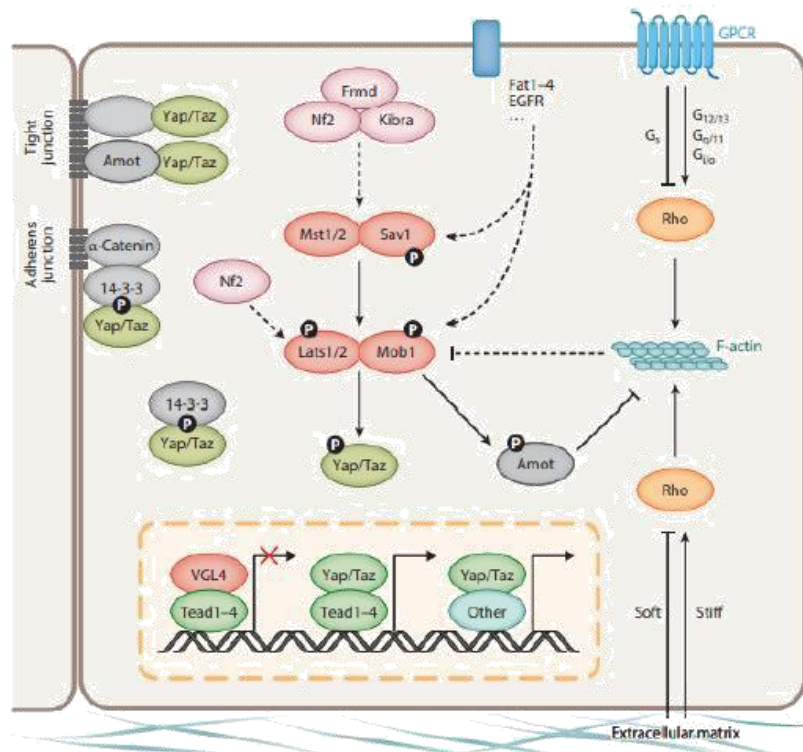
Para além destas proteínas, muitas outras participam da cascata de sinalização da via Hippo. A família de proteínas Amot (Angiomotin) pode também ser regulada pela via Hippo, através da sua interação com as LATS1/2 (Dai et al., 2013; Leung & Zernicka-Goetz, 2013). A fosforilação das proteínas Amot pelas LATS1/2 leva à diminuição da sua afinidade aos filamentos de actina, conduzindo à inibindo da ligação das Amot aos filamentos de actina do citoesqueleto. Esta interação é essencial na regulação de processos como a angiogénese e a migração celular (Dai et al., 2013; Leung & Zernicka-Goetz, 2013). Amot interage também com a proteína YAP, sequestrando-a nas junções de oclusão ou nos filamentos de actina (Chan et al., 2011; W. Wang et al., 2011), como mostrado na Figura 1.7.

Somando, à inibição direta pelas LATS1/2 e pelas Amot, YAP é também inibido pela  $\alpha$ -catenina, que ao formar uma complexo com a 14-3-3, nas junções aderentes (Figura 1.7), o inativa e impede a sua translocação pra o núcleo (Schlegelmilch et al., 2011). A via Hippo responde a sinais de tensão celular, contacto célula-célula e contacto célula-substrato (Wada et al., 2011; Zhao et al., 2012), assim, as interações do YAP com o citoesqueleto tornam-no sensível à reorganização do citoesqueleto e à rigidez da matriz extracelular, fazendo desta proteína o candidato diretamente envolvido na regulação da via Hippo por Mecanotransdução (Dupont et al., 2011).

Foi também observado que alterações na atividade de YAP e TAZ resultam em alterações na atividade da proteína Rho GTPase e no rearranjo do citoesqueleto, através da reorganização das fibras de actina (F. X. Yu, Meng, et al., 2015). De forma semelhante, a atividade das LATS1/2 parece poder ser regulada por sinais mecânicos, de uma maneira dependente da Rho GTPase, sendo estas reguladas positiva ou negativamente (Figura 1.7), dependendo do tipo de estímulo recebido nos recetores GPCR (G protein-coupled receptors) (M. Kim et al., 2013; Reddy & Irvine, 2013; Wada et al., 2011; F.-X. Yu et al., 2012; Zhao et al., 2007, 2012).

Por fim, o complexo Nf2 (Neurofibromatosis 2), Kibra e Frmd6 (FERM domain-containing protein 6), localizado apicalmente nas células, regula positivamente as LATS1/2, contribuindo para a repressão do YAP e TAZ, mostrando que a polaridade celular é outro fator que participa da regulação da via Hippo (Angus et al., 2011; Baumgartner et al., 2010; J. Yu et al., 2010), tal como é exemplificado na Figura 1.7. Para além disto, a proteína Nf2, fora deste complexo, promove a ativação de MST1/2 e LATS1/2, através do seu recrutamento para a membrana citoplasmática, onde estas proteínas são, posteriormente, fosforiladas (Yin et al., 2013).

Podemos concluir, que a via Hippo regula e é regulada por inúmeros fatores, assim, a desregulação desta via é comumente ligada à transformação celular e ao desenvolvimento de tumores.



**Figura 1. 7- A via Hippo e a sua regulação.** Quando não fosforilados o YAP e TAZ interagem com a família de proteínas TEAD e outros fatores de transcrição, no núcleo. No entanto, YAP/TAZ são regulados negativamente de diversas formas: pelos componentes centrais da via Hippo, as quinases MST1/2 e LATS1/2, que o fosforilam; pelas proteínas Amot, que o sequestram nas junções de oclusão; e pelo complexo  $\alpha$ -catenina/14-3-3, que o fosforilam e inativam, nas junções aderentes. Para além da regulação do YAP/TAZ, a via Hippo pode ser regulada por outros mecanismos, tais como polaridade celular, sinalização através dos GPCRs (G protein-coupled receptors) e dos EGFRs (epidermal growth factor receptors) e mecanotransdução. Alterações na reorganização da actina (induzidas por Rho GTPases) são também um dos importantes mecanismos de regulação das LATS1/2; que, por sua vez, regulam a organização da actina no citoesqueleto (por meio das proteínas Amot). Nota: VGL4 é um co-repressor dos fatores de transcrição TEAD, que compete com as YAP/TAZ pela sua ligação. Imagem retirada de Yu et al (2015).

No entanto, tal como mencionado nos subcapítulos anteriores, existe ainda um outro mecanismo que regula a via Hippo revelante de discutir neste trabalho. Vamos agora entender qual o papel do complexo STRIPAK, no qual a proteína Mob4 se integra, na regulação da via que acabámos de introduzir.

### 1.6.1 Regulação da via Hippo por STRIPAK

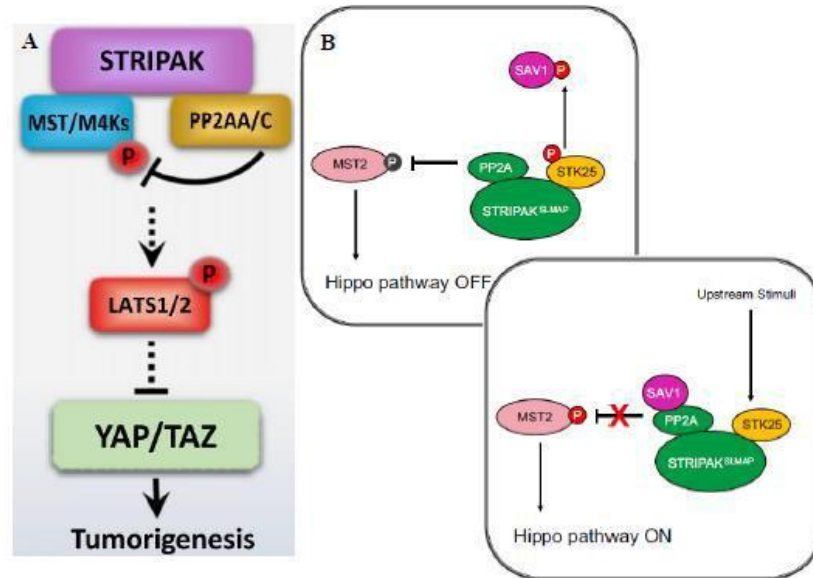
A regulação entre a via Hippo e o STRIPAK é mediada pela proteína SLMAP,37 que induz a PP2A a desfosforilar a MST1/2, inativando-a (Ardestani & Maedler, 2020; Bae et al., 2020; Shi et al., 2016). A inativação destas quinases vai permitir que as formas não fosforiladas de YAP/TAZ sejam translocadas para o núcleo e ativem fatores de transcrição envolvidos em diversos processos celulares (Figura 1.6), nomeadamente proliferação, diferenciação e migração celular. De forma a contrariar este mecanismo, a proteína SAV1, que está ligada à MST1/2 (Figura 1.6), inibe a atividade do SLMAP, na tentativa de restaurar a atividade das quinases MST (Ardestani & Maedler, 2020; Bae et al., 2020). No entanto, a STK25, proteína da família das GCKIII e constituinte do STRIPAK (Figura 1.4), tem a capacidade de, diretamente, fosforilar a SAV1, prevenindo que esta iniba a SLMAP e, conseqüentemente, o STRIPAK (Bae et al., 2020). Este antagonismo mútuo entre a SAV1 e o STRIPAK constitui um dos mecanismos pelo qual este complexo regula a ativação da via Hippo.

Para além da MST1/2, foi demonstrado que proteínas da família das MAP4Ks podem, em paralelo, ativar diretamente as quinases LATS1/2.35 (Meng et al., 2015; Y. Zheng et al., 2015). A MST1/2 e as MAP4Ks apresentam-se como proteínas redundantes, no que diz respeito à ativação da via Hippo, já que depleção de apenas uma delas não é o suficiente para inativar as LATS; a atividade das LATS é apenas comprometida quando ambas estão depletadas em células humanas (Meng et al., 2015). Assim, quer as MST, quer as MAP4Ks, são suficientes, mas não necessárias, para iniciar a cascata de sinalização da via Hippo (Meng et al., 2015). O STRIPAK, de forma semelhante ao que acontece no caso das quinases MST, tem a capacidade de direcionar a atividade da PP2A para as MAP4Ks, promovendo assim a sua desfosforilação e inativação (J. W. Kim et al., 2020; Seo et al., 2020). Estudos de interação proteica revelaram que, para este mecanismo ser ativado, é necessária a presença da STRN4, que vai mediar a interação das MAP4Ks com a PP2A (Seo et al., 2020).

Se a regulação STRIPAK-Hippo é realizada por meio de outros mecanismos e/ou por ação de outros componentes do complexo, tais como a Mob4, não é ainda do meu conhecimento e, presumo, do conhecimento da comunidade científica.

Concluo, que, servindo-se dos dois mecanismos acima descritos, o STRIPAK regula negativamente a via Hippo, controlando a inicialização da sinalização desta via.

Portanto, alterações no complexo STRIPAK resultam, na consequente, desregulação da via Hippo e dos processos biológicos a ela associados.



**Figura 1. 8- Regulação da via Hippo pelo STRIPAK.** (A) Modelo simplificado que demonstra a inibição da via Hippo pelo STRIPAK. A PP2A inibe a fosforilação das quinases MST e das MAP4Ks, permitindo a ativação da YAP/TAZ, no núcleo, o que leva à promoção de processos biológicos potencialmente tumorigênicos. (B) Modelo da regulação do antagonismo STRIPAK-SAV1, pela STK25. A proteína STK25 inativa a SAV1, através da sua fosforilação, o que permite à PP2A inibir a atividade das MST, levando à supressão da via Hippo. Aquando da presença de um estímulo, a SAV1 é libertada da inibição pela STK25 e reprime a PP2A, permitindo a fosforilação das MST, o que vai dar início à cascata de sinalização da via Hippo. Imagens adaptadas de (A) Ardestani and Maedler (2020) e (B) Bae and Luo (2020).

## 1.7 Ferramentas de edição genética

Atualmente, a geração de novos modelos de doenças e métodos para avaliação da função gênica, importantes na pesquisa biológica e biomédica, depende de ferramentas de edição do genoma (Guha et al., 2017; Hruscha et al., 2013; Porteus, 2015). Os termos "edição do genoma" referem-se à manipulação de nucleotídeos do genoma usando nucleases (Ma & Liu, 2015; Porteus, 2015). As nucleases de dedo de zinco projetadas (ZFNs), nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição (TALENs) e repetições palindrômicas curtas regularmente espaçadas (CRISPR) -Cas9, permitem a geração de manipulação de genes específicos e eficientes (Liu et al., 2017; Sertori et al., 2016).

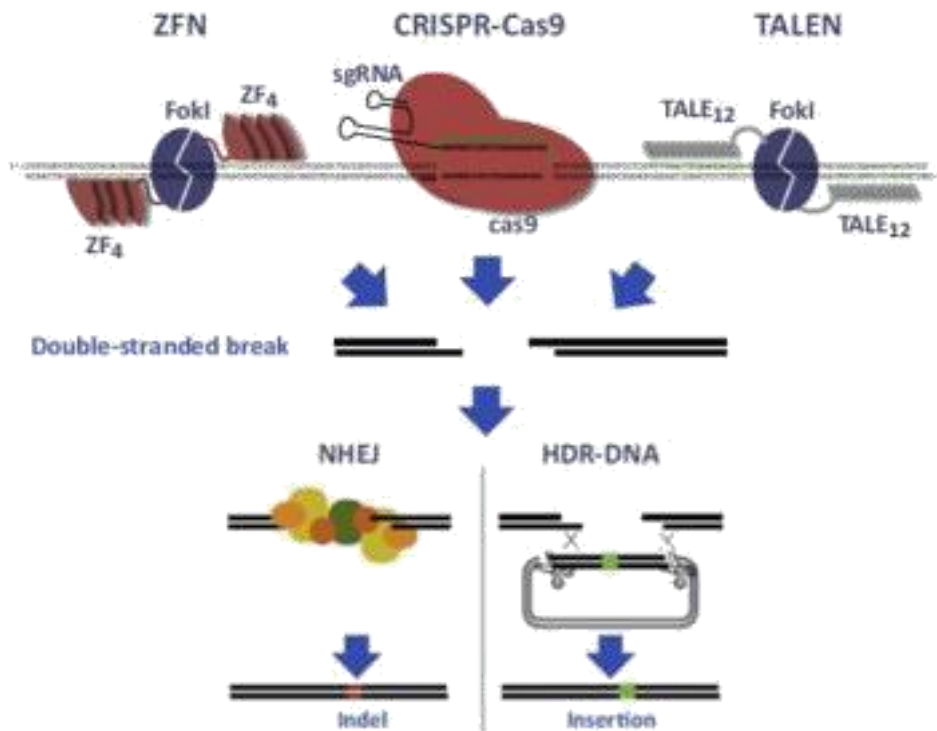
Essas técnicas de edição de genoma dependem da indução de quebras na cadeia dupla (DSB) em locais específicos (Figura 1.5). Uma vez que os DSB são tóxicos (Li et al., 2016), as células respondem rapidamente por meio da via de reparação de junção de extremidade não homóloga (NHEJ). Este é um processo sujeito a erros que leva a inserções ou deleções aleatórias (indels) no locus DSB, o que pode resultar em frameshift ou mutações sem sentido em genes codificadores, com o potencial de silenciar genes (Ata et al., 2016; Guha et al., 2017; Li et al., 2016; Liu et al., 2017; Ma & Liu, 2015).

Os ZFNs foram descobertos em 1996 e usados pela primeira vez em *Drosophila* (Bibikova et al., 2002) e células de mamíferos (Porteus & Baltimore, 2003). Essas endonucleases foram as primeiras a serem aplicadas no peixe-zebra (Sertori et al., 2016), sendo descritas pela primeira vez em 2008 para knockout de gene direcionado (Ata et al., 2016). ZFNs reconhecem DNA através de um domínio de ligação de DNA mediado por dedo de zinco e clivam o genoma com um domínio FokI com atividade de nuclease (Ma & Liu, 2015). Essas endonucleases são projetadas em pares, permitindo apenas a clivagem por meio da dimerização da nuclease FokI, quando ambos os pares identificam as cadeias de DNA de forma adjacente (Sertori et al., 2016).

TALEN foi descoberto pela primeira vez em patógenos de plantas (Sertori et al., 2016) (Ata et al., 2016) e descrito pela primeira vez no peixe-zebra em 2012 (Dahlem et al., 2012). Esta endonuclease é formada pela fusão do domínio de nuclease de FokI a um domínio de ligação de DNA com múltiplas repetições idênticas da proteína TALE. Cada repetição TALE liga-se a um nucleotídeo específico por meio de repetições de di-resíduos variáveis (RVD), permitindo o reconhecimento do DNA (Guha et al., 2017; Sertori et al.,

2016). Em um processo semelhante aos ZFNs, a dimerização de FokI só ocorre quando os TALENs são pareados (Ata et al., 2016; Sertori et al., 2016).

O CRISPR associado à endonuclease Cas9 é uma ferramenta de edição do genoma usada pelo sistema imunológico bacteriano como mecanismo de defesa contra vírus (Gonzales & Joanna Yeh, 2014; Kouranova et al., 2016; Ratner et al., 2016). Nesta estratégia de proteção, as bactérias integram DNA estranho (espaçador) entre as sequências de 5'-NGG-3 'PAM (motivo adjacente do protoespaçador) específicas de vírus infetantes. Portanto, quando o vírus ataca a mesma bactéria, esta irá produzir crRNA (sequência complementar ao espaçador) e tracrRNA (RNA CRISPR transitivado) e criar um complexo com a proteína Cas9, gerando o que normalmente é designado como holoendonuclease Cas9 (Kouranova et al., 2016; Li et al., 2016). Este complexo possui um domínio que se liga ao PAM genômico, reconhece o espaçador e corresponde à sequência de DNA do vírus genômico. Por último, o Cas9 faz um DSB na sequência de DNA do vírus genômico próximo ao PAM e desativa o DNA do agressor (Li et al., 2016). Este mecanismo natural tem sido usado e otimizado para edição de genoma nos últimos anos. Existem vários tipos de sistemas CRISPR / Cas estrutural e mecanicamente diferentes (Ratner et al., 2016). O sistema tipo II, usando um Cas9 e um RNA guia (sgRNA) que resulta da fusão de crRNA e tracrRNA, é o mais usado para a edição do genoma (W. Y. Hwang et al., 2013; Kouranova et al., 2016; Liu et al., 2017; Ran et al., 2013; Ratner et al., 2016). Neste sistema, um sgRNA previamente projetado para uma região alvo no genoma é co-injetado com mRNA Cas9 ou proteína na célula (W. Y. Hwang et al., 2013; Li et al., 2016; Ran et al., 2013). No núcleo celular, o sgRNA ancorado à proteína Cas9 permite o reconhecimento da região alvo no genoma (complementar ao sgRNA) ao lado de uma sequência PAM. Este complexo desenrola as duas cadeias de DNA e as cliva (Kouranova et al., 2016; Li et al., 2016). Como referido antes, este processo sujeito a erros leva a mutações aleatórias com o potencial de silenciar genes (Li et al., 2016; Liu et al., 2017) (Irion et al., 2014).



**Figura 1. 9 - Visão esquemática de técnicas de edição de genoma e mecanismos de reparação de DNA.** No canto superior esquerdo, há um mecanismo ZFN de edição de DNA por meio de FokI acoplado a duas guias de dedo de zinco, uma em cada cadeia de DNA genômico. No centro superior, há uma proteína Cas9 acoplada a um pequeno sgRNA, reconhecendo e ligando-se à sequência genômica alvo. Por outro lado, no canto superior direito está FokI acoplado a dois TALE que reconhecem a região no DNA. Todas as técnicas de edição de genoma permitem DNA DSB, reparado de forma imprecisa por meio de união de extremidades não homólogas levando à formação de indel. Se um modelo de DNA estiver disponível, ele também pode ser inserido na região de DNA quebrada por reparação Direcionado por Homologia. (Adaptado de Li et al. 2016)

ZFN é uma técnica cara, e difícil de projetar (Hruscha et al., 2013), tem uma alta taxa de falha gerando a montagem de ambas as endonucleases (Sertori et al., 2016) e não há garantia de que a proteína será mutagênica in vivo, uma vez que a especificidade de cada proteína é variável (Li et al., 2016). A edição do genoma TALEN é mais confiável e eficiente do que ZFN (Sertori et al., 2016). No entanto, foi relatado que FokI é sensível à metilação do DNA (Li et al., 2016) e, embora o design seja mais fácil do que ZFNs, a clonagem é trabalhosa (Hruscha et al., 2013). Ambas as técnicas de edição de genoma

requerem um projeto complexo de duas novas proteínas para cada local alvo (Gonzales & Joanna Yeh, 2014; Sertori et al., 2016) e não são adequadas para mutagênese de alto rendimento (Varshney et al., 2016). CRISPR / Cas9 surgiu como um sistema fácil de projetar e implementar, exigindo apenas o projeto de um sgRNA de 20 nucleotídeos (Gonzales & Joanna Yeh, 2014; Hruscha et al., 2013; Liu et al., 2017; Varshney et al., 2016), simples, econômico, escalável (J. Hwang & Pallas, 2014; Liu et al., 2017) (Jao et al., 2013) com eficiência comparável ou superior e mais eficaz no DNA metilado (Gonzales & Joanna Yeh, 2014; Hruscha et al., 2013). Esta técnica de mutagênese permite ter como target vários genes de uma vez (Varshney et al., 2016) com taxas de transmissão mais altas em comparação com os sistemas mencionados acima (Gonzales & Joanna Yeh, 2014; Liu et al., 2017) e baixo potencial de efeitos “out of target” (Hruscha et al., 2013; Liu et al., 2017; Veres et al., 2014).

Embora os morfolidos (MO) ainda sejam considerado por alguns como o conjunto de ferramentas tradicional para validação funcional complementar da função do gene (Ata et al., 2016; Liu et al., 2017), no peixe-zebra o seu uso é limitado a processos em estágios iniciais de desenvolvimento (0-120 horas pós-fertilização [hpf]) (Liu et al., 2017; Seth et al., 2013). Vários estudos demonstraram que, embora os morfolidos permitam um estudo rápido e eficaz da função do gene (Seth et al., 2013), os fenótipos geralmente resultam em alvos indesejados (Kok et al., 2015; Sertori et al., 2016; Varshney et al., 2016) e  $\approx 80\%$  dos knockouts do gene não imitam o fenótipos MO para o mesmo gene (Kok et al., 2015; Liu et al., 2017; Sertori et al., 2016; Varshney et al., 2016). Rossi e colegas em 2015 propõem que, em um knockout completo do gene, um mecanismo genético de compensação por outros genes relacionados pode ocorrer balanceando os fenótipos observados em MO para o mesmo gene (Liu et al., 2017; Sertori et al., 2016) (Rossi et al., 2015). Assim, MO não podem recapitular com precisão fenótipos de knockout in vivo.

### **1.7.1 CRISPR/Cas9 em células humanas**

O desenvolvimento e criação de uma linha de células de mamíferos para uma terapêutica recombinante, resume-se geralmente em três etapas: engenharia da célula hospedeira, seleção e screening da linha celular.

Inicialmente, o gene recombinante com os elementos reguladores da transcrição necessários é transferido para as células. Novos genes são tipicamente introduzidos no genoma da célula por transfeção de um plasmídeo linearizado carregando o gene de interesse e um marcador de seleção (por exemplo, resistências a antibióticos ou DHFR). Essa integração é aleatória, afetando a produtividade devido ao número de cópias e variações do site de integração. Geralmente, o gene de interesse está sob o controle de um forte promotor viral ou de mamífero levando a alta expressão, enquanto o marcador de seleção é colocado sob o controle de um promotor fraco (Wurm, 2004), de modo a não sobrecarregar metabolicamente as células (Veraitch & Al-Rubeai, 2005). A exposição das células a uma pressão de seleção promove a integração de ambos os genes no genoma (Wurm, 2004). No entanto, a expressão do marcador de seleção nem sempre se correlaciona com o gene de interesse - uma vez que diferentes promotores podem ser usados, a integração parcial/mutada do gene ou o silenciamento do gene de interesse podem ocorrer.

Após a seleção, os clones sobreviventes são transferidos como células únicas para um segundo recipiente de cultivo e expandidos para produzir populações monoclonais. Eventualmente, os clones individuais são selecionados para a expressão da proteína recombinante com os maiores produtores sendo retidos para posterior cultivo e análise. Uma linha celular, contendo as taxas de crescimento e produtividade adequadas, é então escolhida para a produção da proteína recombinante. Estudos adicionais de estabilidade também precisam ser realizados para garantir uma linha de células monoclonais de expressão estável. Um processo de cultivo é então estabelecido de acordo com as necessidades de produção.

A perturbação genética é uma abordagem poderosa para a análise da função da proteína *in vivo*. A tecnologia de edição de genes baseada em sistema de repetições palindrômicas curtas (CRISPR) / associadas a CRISPR (Cas) regularmente inter-espaçadas revolucionou a geração de knockouts de genes em células humanas (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013). No entanto, temos aproximadamente 2,000 genes nas

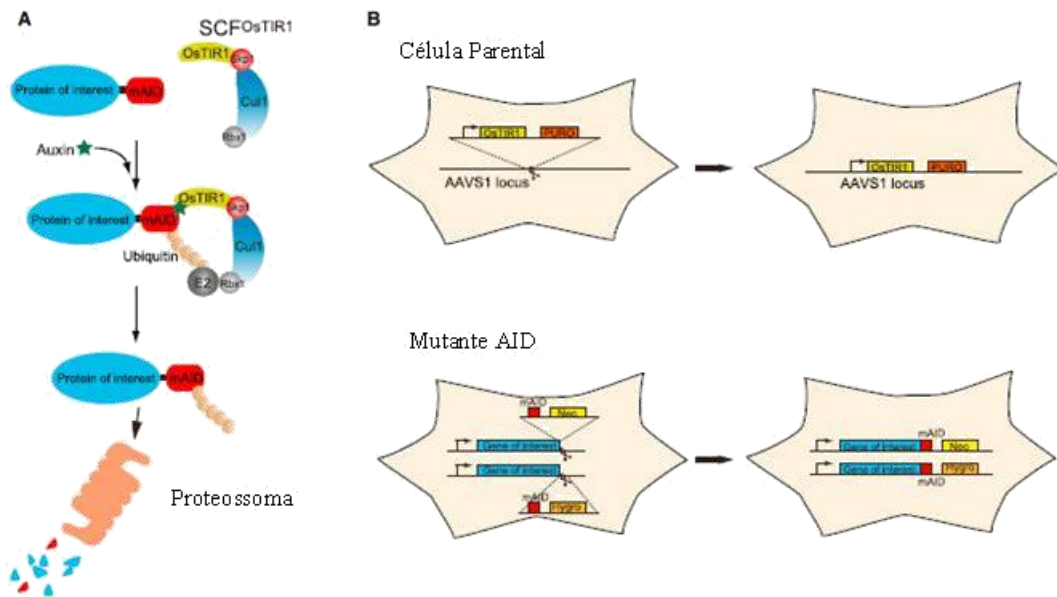
linhas celulares humanas que são essenciais para a viabilidade celular, onde muitos estão envolvidos em processos importantes para o sucesso da proliferação. Uma vez, que estes genes não podem ser perturbados de uma forma constitutivamente, a inativação/depleção condicional ou a depleção de proteínas codificantes é útil para a análise funcional (Hart et al., 2015; T. Wang et al., 2015) (Natsume et al., 2016)

A inativação/depleção condicional pode ser alcançada pela fusão de um domínio desestabilizador (o chamado “degron”) que pode ser controlado condicionalmente. Várias tecnologias de “degron” condicional, que permitem controlar a estabilidade de proteínas “degron-fused” pelo uso de uma pequena molécula, foram estabelecidas (Banaszynski et al., 2006; Bonger et al., 2011; Chung et al., 2015; Iwamoto et al., 2010; Neklesa et al., 2011). Para o desenvolvimento deste projeto, recorreremos à tecnologia desenvolvida por Nishimura et al., 2009. Desenvolveram uma tecnologia de degron indutível por auxina (AID) por meio do transplante de uma via de degradação específica de planta controlada por um fito hormônio, auxina, em células não vegetais (Nishimura et al., 2009). Em células que expressam a proteína F-box TIR1 preceptiva de auxina, que forma uma ubiquitina ligase SCF (Skp1-Cullin-F-box) funcional, as proteínas fundidas com uma marca AID derivada da proteína IAA17 de *Arabidopsis thaliana* podem ser induzidas para rápida degradação por a adição de auxina ao meio de cultura. Crucialmente, a tecnologia AID permite a depleção condicional, tornando todo o processo rápido, normalmente com uma meia-vida de 10-20 min (Holland et al., 2012; Lambrus et al., 2015; Natsume et al., 2016). Assim, o sistema AID representa uma tecnologia muito promissora para a análise dos genes fundamentais ao funcionamento das células humanas, porém a dificuldade de criar proteínas de fusão endógenas com o tag AID, limitou o uso desta técnica. Desta forma, para contornar este problema, os autores estabeleceram um novo método, com recurso à técnica de CRISPR/Cas, em células HCT116 de cancro colorretal humano, que consistiu na marcação dos genes endógenos com vetores doadores. Estes vetores continham braços de homologia curtos sintéticos. A linha HCT116 foi escolhido devido a ter um cariótipo estável (Natsume et al., 2016).

A construção de mutantes AID condicionais depende da introdução de dois componentes nas células. O primeiro componente é a proteína F-box responsiva à auxina, TIR1, que forma uma ubiquitina ligase SCFTIR1 funcional com as subunidades endógenas conservadas em todas as células eucarióticas (Figura 1.6 A). Além disso os autores, usaram TIR1 derivado de *Oryza sativa* (OsTIR1), porque funcionou melhor do

que seu homólogo em *A. thaliana* em temperaturas mais elevadas (Nishimura et al., 2009). O segundo componente é a marca AID que é fundida à proteína de interesse no locus endógeno. (Figura 1.6 A) (Kubota et al., 2013; Nishimura & Kanemaki, 2014).

Para construir células AID humanas condicionais, tem que se adotar uma abordagem de duas etapas (Figura 1.6 B). Inicialmente, a geração das células parentais é feita pela introdução de um vetor de expressão que codifica OsTIR1 no locus AAVS1 usando CRISPR / Cas (Mali et al., 2013; Smith et al., 2008). Posteriormente, uma cassette mAID in-frame foi introduzida por CRISPR / Cas na linha celular parental, após o último codon do gene de interesse. É feita também a co-transfecção de dois vetores de doadores de homologia curta contendo marcadores de resistência à neomicina (Neo) e higromicina (Hygro), a fim de marcar ambos os alelos simultaneamente selecionando células na presença de G418 e Hygro (Figura 1.6 B) (Park et al., 2014). Desta forma, é possível gerar mutantes AID condicionais por uma única transfecção e subsequente clonagem da linha celular parental (Natsume et al., 2016).



**Figura 1. 10- Construção de mutantes de AID condicionais humanos.**

(A) Uma ilustração esquemática do sistema AID. O OsTIR1 expresso pode formar um complexo SCFOsTIR1 E3 ligase funcional com os componentes endógenos em células humanas (Nishimura et al., 2009). Na presença de auxina, uma proteína de interesse fundida com mAID é rapidamente degradada após poli-ubiquitilação. (B) Uma ilustração esquemática que mostra a estratégia de construção de mutantes AID condicionais humanos. Inicialmente, as células parentais devem ser geradas pela introdução de um transgene que codifica OsTIR1 no locus AAVS1 de porto seguro. Marcando os dois alelos de um gene alvo de interesse com mAID nas células parentais, mutantes condicionais de AID podem ser gerados.

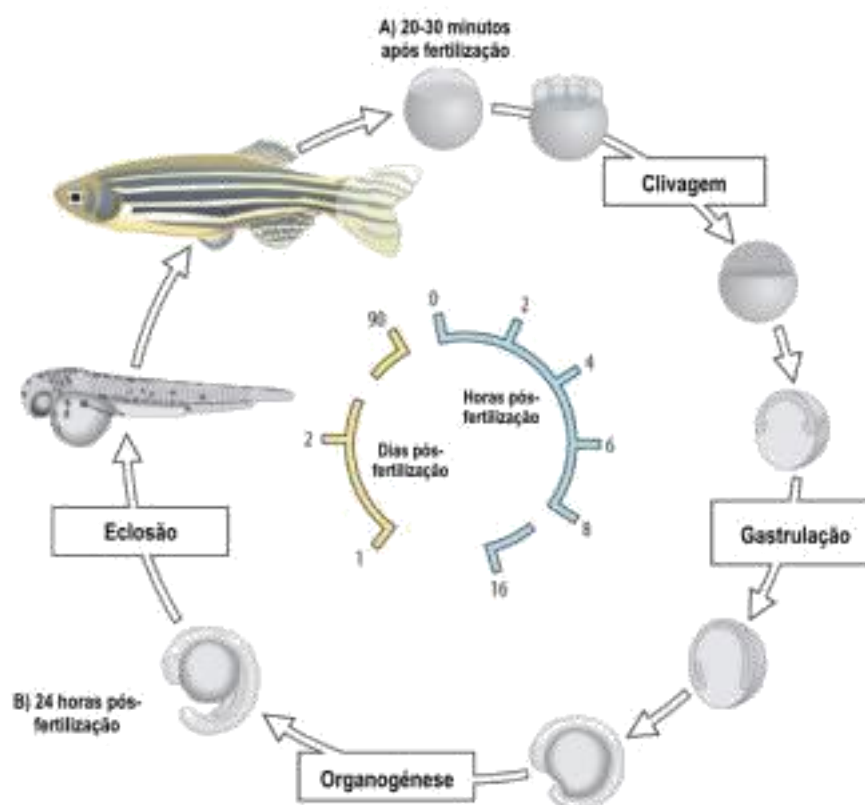
### 1.7.2 CRISPR/Cas9 em zebrafish para o knockout do gene

De forma a gerar um knockout de gene no peixe-zebra de uma maneira barata e de alto rendimento, a tecnologia CRISPR / Cas9 e a via de reparação de NHEJ consequente é a técnica mais fácil e eficaz. O CRISPR-Cas9 foi originalmente adaptado e usado no peixe-zebra por Hwang e colegas em 2013 (W. Y. Hwang et al., 2013). Neste estudo, eles direcionaram o gene fh do peixe-zebra ao projetar um sgRNA complementar à sequência do gene e micro injetaram este sgRNA com o mRNA Cas9 sintetizado em embriões em estadios de uma célula. Observaram a formação de indel em todas as concentrações

testadas em quase todos os embriões. Os autores encontraram altas frequências de indels na maioria dos locais-alvo testados e uma mutagênese de eficiência significativa (W. Y. Hwang et al., 2013) . Várias ferramentas foram criadas para a implementação do CRISPR/Cas9 no peixe-zebra (Li et al., 2016; Liu et al., 2017) tornando este sistema uma alternativa mais simples, mais eficiente e barata para a edição do genoma neste organismo modelo.

### **1.8 Zebrafish (*Danio Rerio*) como modelo animal**

Entre os organismos modelo, o peixe-zebra (*Danio rerio*) é um dos melhores modelos líderes para estudar a biologia do desenvolvimento, cancro, toxicologia, descoberta de drogas e genética molecular. O peixe-zebra tem muitas semelhanças fisiológicas e genéticas com os humanos, incluindo o cérebro, o trato digestivo, a vasculatura e o sistema imunológico inato (Khan & Alhewairini, 2018). Este vertebrado tem uma vida útil ligeiramente maior do que outros modelos, como roedores (Van houcke et al., 2015) (Gilbert et al., 2014), é barato e fácil de manter para análise mutacional de alto rendimento (Van houcke et al., 2015) (Gilbert et al., 2014) (Kishi et al., 2008; Sasaki & Kishi, 2013). O peixe-zebra tem alta fecundidade e produz ovos transparentes que garantem acessibilidade à organogênese e mudanças fenotípicas ao longo do tempo (Van houcke et al., 2015) (Sasaki & Kishi, 2013; Verduzco & Amatruda, 2011) (Kishi et al., 2009). O desenvolvimento embrionário (Figura 1.6) ocorre rápido e externamente e a manipulação do desenvolvimento genético é facilmente alcançada (Sasaki & Kishi, 2013; Verduzco & Amatruda, 2011) (Holtzman et al., 2016). Além disso, o genoma do peixe-zebra é totalmente sequenciado e esta espécie tem pelo menos um ortólogo para 71% dos genes codificadores de proteínas humanas (Gilbert et al., 2014) (Kishi et al., 2008) (Howe et al., 2013).



**Figura 1. 11- Representação esquemática do desenvolvimento embrionário do peixe-zebra.**

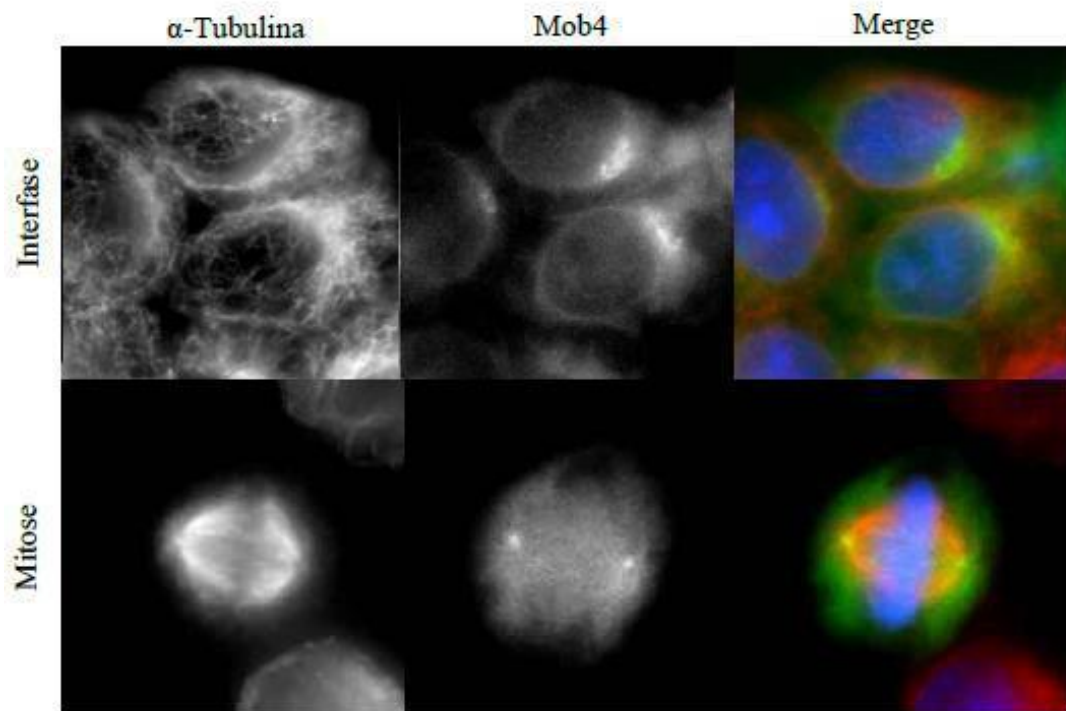
## **1.9 Resultados anteriores que motivam este estudo**

### **1.9.1 Resultados prévios em células humanas**

Por fim, analisemos com mais detalhe os resultados já adquiridos no laboratório Cell Cycle and Cancer Biology Group, obtidos pelos meus colegas e que motivaram este estudo. A *Drosophila melanogaster* e as células humanas têm sido os modelos empregados no estudo da Mob4, no entanto, para esta seção vou apenas focar-me nos resultados obtidos em células humanas, células HeLa, devido à sua maior pertinência para este projeto, em particular.

Estudos de localização, em células HeLa, revelaram que a Mob4 se agrega na zona perinuclear das células em interfase (Cláudia Florindo, 2007, dados não publicados), numa marcação que poderá ser semelhante à do Golgi31 (Dickson et al., 2020; Presley et al., 1998), ou do retículo endoplasmático (Goujon et al., 2019; Yadav et al., 2013) ou,

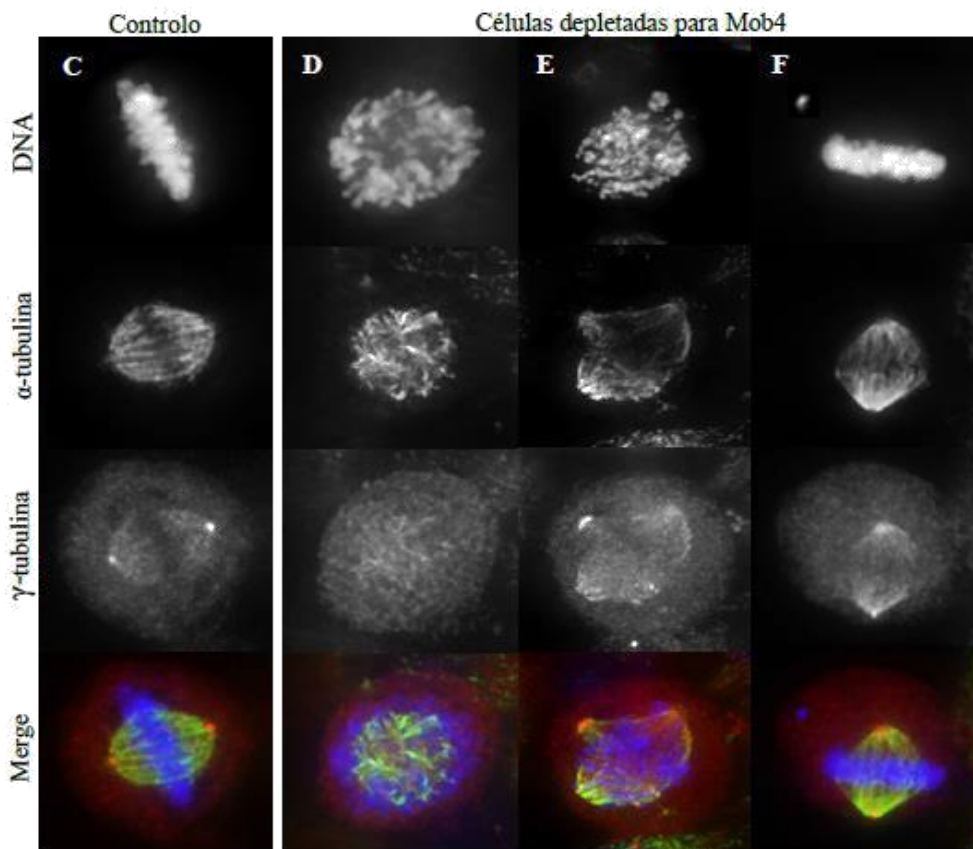
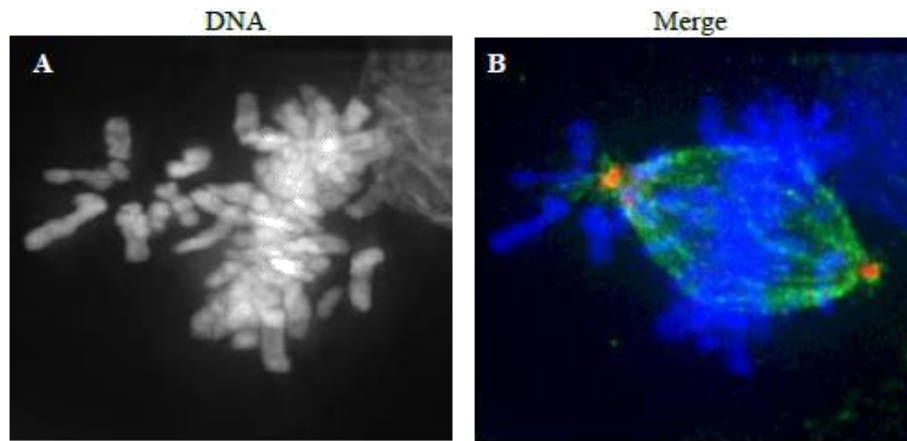
talvez, ambos, como é de observar na Figura 1.12. Já em mitose, Mob4 parece estar localizada em dois pequenos agregados nos polos do fuso mitótico (Figura 1.12) (Cláudia Florindo, 2007, dados não publicados), sendo esta marcação semelhante à dos centrossomas (Bergmann et al., 2020; Fang et al., 2016; Holdgaard et al., 2019). Estes resultados revelam uma potencial co-localização entre Mob4 e o Golgi, retículo endoplasmático (em interfase) e centrossomas (em mitose), anunciando que esta proteína poderá desempenhar uma função estrutural ou reguladora nestes organelos.



**Figura 1. 12- Localização de Mob4 em células HeLa, em interfase (em cima) e em mitose (em baixo).** Em interfase, Mob4 apresenta-se localizada perinuclearmente, enquanto, que em mitose aparenta estar localizada em dois agregados, nos polos do fuso. Azul-DNA, vermelho- $\alpha$ -tubulina, verde-Mob4. Cláudia Florindo, 2007, dados não publicados.

De modo, a melhor desvendar a função desta proteína foi realizada a sua depleção em células HeLa. A depleção de Mob4, por iRNA, mostrou um aumento de defeitos mitóticos nas células (Cláudia Florindo 2007, dados não publicados), sendo que entre os principais estão: defeitos no alinhamento dos cromossomas e defeitos na formação do fuso mitótico (tais como, colapso do fuso mitótico, fuso mitótico malformado e fuso mitótico descentrado do plano celular), como é passível de observar na Figura 1.13.

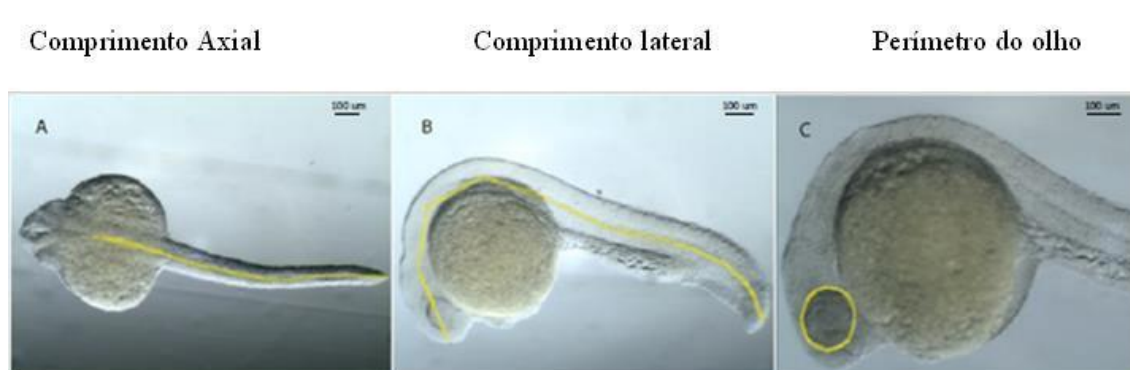
Os resultados acima apresentados apontam para a Mob4 como uma potencial proteína reguladora do ciclo celular, visto que tais defeitos conduzem, na sua maioria, à paragem da divisão celular, em mitose, seguida de morte celular. Desta forma, Mob4 poderá ser necessária para a progressão da mitose. Para além disto, os defeitos no alinhamento dos cromossomas mitóticos reportados são idênticos aos observados aquando da depleção de proteínas do cinetocoro (Huang et al., 2009; McEwen et al., 2001), tais como as proteínas CENP (centromere proteins), o que pode significar que a Mob4 desempenha importantes funções nos cinetocoros, sendo necessária para a correta ligação microtúbulos-cinetocoros. O presente estudo foi conduzido de modo a confirmar e continuar a desvendar a função biológica da Mob4 em mitose.



**Figura 1. 13- Principais defeitos mitóticos causados pela depleção de Mob4 em células HeLa.** (A-B) Defeitos no alinhamento dos cromossomas mitóticos em metafase. (C-F) Defeitos mais frequentes no fuso mitótico em células depletadas de Mob4, tais como (D) colapso do fuso, (E) fuso malformado e (F) fuso não centrado no plano celular; (C) Célula controlo, não depletada de Mob4, sem defeitos no fuso mitótico. Azul-DNA, verde-  $\alpha$ -tubulina, vermelho-  $\gamma$ -tubulina. *Cláudia Florindo, 2007, dados não publicados.*

### 1.9.2 Resultados prévios em *Zebrafish*

De forma, a estudar o Mob4/phocein em *Zebrafish*, foi feito em laboratório, por alunos de mestrado, um tratamento com morfolidos, em embriões de zebrafish. Foi feita a injeção dos morfolidos quando os embriões se encontravam em “one-cell-stage”, e foram analisados após 24 horas (Fase de faringula), de forma a compreender o fenótipo após depleção de Mob4/phocein. Com a realização deste trabalho pretendeu-se analisar o desenvolvimento embrionário de peixe-zebra, às 24 horas pos-fertilizacao, apos depleção de MOB4 com Morfolino, dando mais importância à região da cabeça em geral e do cérebro posterior em particular. Desta forma, foram feitas medições ao comprimento axial, lateral e o perímetro do olho (Figura 1.7), de forma a compreender, se o embrião sofria alterações nestas estruturas. Além disso, foi também analisado o índice mitótico no olho, com a deleção do Mob4/phocein.



**Figura 1. 14- Exemplo das medições efetuadas, nos embriões 24h após depleção do MOB4**

Com este trabalho, foi possível observar que a falha de função da proteína Mob4 se traduz em graves problemas no desenvolvimento embrionário do peixe-zebra às 24 horas pós fertilização. Em particular, na ausência de MOB4, o olho não se desenvolvia de todo. O baixo índice mitótico, que foi observado, parecia estar subjacente à causa desta falha observada nos olhos dos embriões. Neste sentido, concluíram que a proteína Mob4 é essencial para uma normal proliferação celular e, que na sua ausência, o embrião falha o desenvolvimento por falta de células.

Assim, estando finalmente introduzidos os fundamentos teóricos em que se baseia este estudo e apresentada toda a informação necessária para a compreensão deste, passo agora a definir os objetivos primários deste trabalho.

## 1.10 Objetivos

O funcionamento correto da divisão celular é essencial para que o material genético seja transmitido, de forma que uma célula progenitora dê origem a duas células filhas geneticamente idênticas, assegurando a continuidade da vida. No caso deste processo ser comprometido, poderão surgir várias complicações como por exemplo o aparecimento de cancro. No entanto, grande parte dos mecanismos de controlo e execução da divisão celular continuam por ser esclarecidos. O trabalho tem como principais objetivos criar ferramentas biológicas que permitam avançar no estudo das funções da proteína Mob4. Este objetivo é duplo pois pretende-se

- i) Criar linhas celulares humanas que permitam a degradação indutível da proteína Mob4, de modo a poder-se analisar a sua função em alturas específicas do ciclo celular;
- ii) Criar linhas mutantes de peixe zebra nulas para o gene Mob4, de modo a poder-se estudar a sua função ao longo do desenvolvimento, num vertebrado.

De forma a cumprir este objetivo iremos recorrer a várias técnicas de biologia molecular, descritas ao longo do trabalho, assim como ao uso de células humanas e *Zebrafish* como modelo de estudo.

## **2. Metodologia**

Todo o procedimento relativo à técnica de CRISPR que deu origem à linha celular CRAL1, que foi usada neste estudo, foi realizado pela aluna de Doutorado Inês Baião Santos.

### **2.1 Linhas celulares**

No decorrer do trabalho foi usado a linha celular HCT-116 tet-OsTir1 (Natsume et al., 2016), que como explicado anteriormente, foi modificada para ocorrer a produção de OsTir1, aquando da sua indução. Através desta linha celular, foi criada em laboratório, com auxílio da técnica de CRISPR-Cas9, a linha celular, denominada de CRAL1, contendo a proteína de fusão MOB4/Phocein-GFP.

### **2.2 Cultura de Células**

As células necessitam de uma manutenção periódica, devido à proliferação e expansão celular. Esta expansão é devida ao metabolismo celular, que ao efetuar trocas com o meio, o torna mais ácido, resultando numa alteração da cor deste, de vermelho para laranja/amarelo, e isto deve-se à presença de vermelho fenol, um indicador de pH. Desta forma, a cor do meio, por si só, indica-nos quando devemos proceder à manutenção da nossa cultura celular.

As linhas celulares usadas no decorrer do trabalho (Tabela 2.1), foram mantidas usando o meio McCoy's 5A 1x (modified) (Gibco® Life Technologies, ref. 26600-023), que continha L-Glutamina, suplementado com 5% de Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco® Life Technologies). As células foram cultivadas em placas de Ø5 cm (SLP Life Sciences, Korea) e mantidas numa incubadora (Thermo Electron Corporation 311, Canada) a 37 °C com 5% dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). A passagem de células (subcultura) era realizada a cada 2-3 dias, quando a confluência atingia os 70-80%. Este processo consistia na aspiração do meio, seguida de uma pré-lavagem com 1x Phosphate Buffered Saline (PBS; Sigma Aldrich, USA). De seguida as células eram destacadas das placas de cultura, pela adição de 1x tripsina (Sigma Aldrich, USA), previamente, diluída (1:10) em 1x PBS, e

incubadas durante 3-5 min na incubadora (37°C). Após o tempo, as células eram observadas ao microscópio de forma a garantir a suspensão celular total. Por fim, adicionou-se 5ml de meio McCoy's 5A, ressuspensando gentilmente, diluindo a 1:10, para placas de cultura novas. A tripsina pertence à família de proteases de serina, e, através da clivagem de péptidos, permite o destacamento das células da placa de cultura.

Todos os procedimentos foram efetuados sobre condições de esterilidade com recurso a uma Câmara de Fluxo Laminar (Microflow, advanced biosafety cabinet class II, UK). Para tal, a câmara de fluxo laminar era ligada 15 minutos antes de qualquer manipulação. O PBS 1x, meio de cultura e tripsina foram previamente aquecidos a 37°C em banho-maria.

**Tabela 2. 1- Linhas celulares usadas ao longo do trabalho**

|                       | Meio de cultura  | Referência             |
|-----------------------|--|------------------------|
| HCT-116<br>tet-OsTir1 | Meio McCoy's 5A suplementado com 5% de SFB,<br>L-Glutamina | (Natsume et al., 2016) |
| CRAL1                 | Meio McCoy's 5A suplementado com 5% de SFB,<br>L-Glutamina | _____                  |

### 2.3 Congelamento das células

De forma a preservar as linhas celulares usadas ao longo do estudo, estas eram expandidas em placas de Ø10 cm, e passado 2 a 3 dias, quando chegavam a uma confluência de 70-80%, eram lavadas com PBS 1x, e de seguida estas eram destacadas com o auxílio de Tripsina 1x. As placas com tripsina incubavam durante 3-5 min a 37°C na incubadora ThermoScientific e de seguida eram observadas ao microscópio, de forma a garantir a suspensão total das células. No passo seguinte o meio correspondente era adicionado, com a intenção de diluir a tripsina, e todo o conteúdo era colocado num tubo Falcon 50ml (VWR). Este tubo Falcon, com as células em suspensão, era sujeito a uma centrifugação de 1000 rpm (rotações por minuto) na centrífuga durante 5 minutos. No, 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

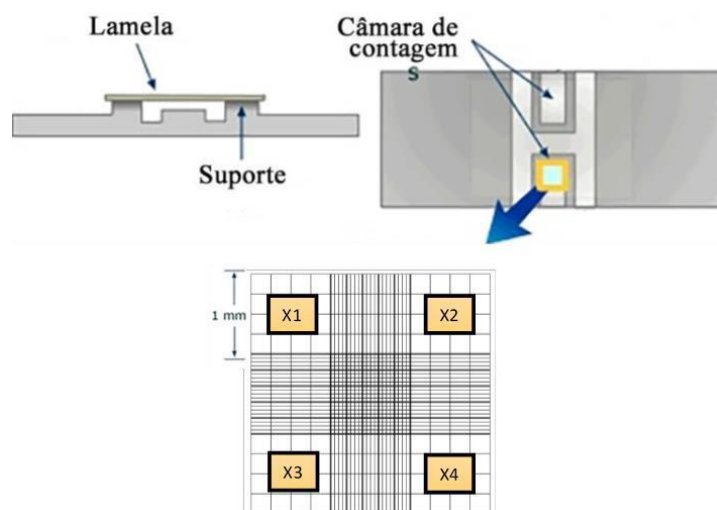
do operador e o número de passagens efetuadas, assim como a solução congelante, que era composta por 10% DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma), 10% Meio MaCoy's 5A (Gibco® Life Technologies, ref. 26600-023) e 80% FBS (Gibco® Life Technologies). Após a centrifugação o sobrenadante foi aspirado, e o pellet, que continha as células, foi ressuspenso na solução congelante. De seguida, o conteúdo foi dividido entre os tubos de criopreservação (1 ml por tubo), sendo estes imediatamente colocados em gelo durante 20 minutos. Por fim, os tubos de criopreservação eram enrolados em papel científico e colocados numa arca de congelação (ThermoScientific) a -80 °C. No dia seguinte, os tubos de criopreservação eram desenrolados do papel e colocados numa caixa e guardados a -80 °C. É essencial que este processo ocorra de uma forma lenta, sendo necessária a adição de DMSO, dada a sua capacidade anticongelante, que garante uma lenta desidratação, impedindo, assim, a formação de cristais de água dentro das células, e por sua vez impedir a rutura destas.

#### **2.4 Descongelamento das células**

Todas as células anteriormente expandidas e armazenadas a -80 °C, servem de stock, e garantem uma preservação das condições da linha original, assim como um número de passagens baixos. O processo de descongelamento, contrariamente ao de congelamento, tem de ser realizado rapidamente, devido à toxicidade do DMSO para as células, de forma a impedir uma perda significativa destas. Desta forma, o crio-tubo que contém as células, após retirado do -80 °C, foi rapidamente aquecido a 37 °C em banho-maria, durante, aproximadamente, 1 minuto. De seguida, as células (1 ml) são colocadas num Falcon de 50 ml, com 4ml de meio, previamente aquecido, e centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi aspirado e as células foram resuspenso em 5 ml de meio fresco, sendo a totalidade do volume transferido para uma placa de cultura de células. No dia seguinte, procedeu-se à mudança do meio de cultura apenas, para retirar as células mortas e os restos de DMSO.

## 2.5 Contagem de células

Por vezes é necessário plaquear um número específico de células, e para tal, as células eram contadas com recurso à Câmara de Neubauer (Blau brand, Germany). Todo o processo para obter as células em suspensão é idêntico ao processo explicado no ponto 2.2 Cultura de células. Quando as células foram resuspendidas, todo o conteúdo foi adicionado num Falcon de 50 ml. Desta suspensão foi retirado 10  $\mu\text{L}$ , que foram misturados com 10  $\mu\text{L}$  de Trypan Blue (Sigma Aldrich, UK). De seguida, foram transferidos 10  $\mu\text{L}$  desta solução para a câmara de Neubauer e procedeu-se à contagem de células, sem coloração azul, presentes nos quatro quadrantes exteriores, como representado na Figura 2.1, no microscópio. A concentração celular foi calculada com recurso à seguinte fórmula  $[(X1+X2+X3+X4)/4] \times 2 \times 10^4$  células/ml. Significa que dividimos o número médio de células, presentes em cada quadrante, por o fator de diluição da nossa solução e de seguida dividimos o resultado pelo volume da câmara (tem 0.1mm de profundidade, resultando num volume de  $0.1\text{mm}^3$ , que é convertido para 0.1  $\mu\text{L}$  ou  $10^{-4}\text{ml}$ ). Por fim, foi retirado o volume necessário, da suspensão celular, e ressuspendido num Falcon com meio, de forma a ficar com a concentração final pretendida, e plaquear um número específico de células. Por forma a, a garantir um espalhamento homogéneo das células pela placa, após plaquear, esta é agitada lentamente em várias direções e são depois guardadas na incubadora.



**Figura 2. 1- Esquema da câmara de Neubauer.**

## **2.6 Imunofluorescência das células**

A técnica de imunofluorescência possibilita a visualização de proteínas, em células ou tecidos, pelo uso de anticorpos específicos, que, têm acoplados um fluorocromo capaz de absorver luz num comprimento de onda específico, emitindo a luz num comprimento de onda menor, permitindo assim, a sua visualização no microscópio. Para a imunofluorescência, as células foram plaqueadas, dois dias antes, a uma concentração de  $0.5 \times 10^5$ , sobre lamelas de 12 mm de diâmetro, em placas de 24 poços. De forma, a garantir a concentração desejada, as células foram previamente contadas na câmara de Neubauer. Aquando da realização da imunofluorescência a confluência das células encontrava-se nos 70-80%.

### **2.6.1 Método de fixação com Formaldeído 3.7%**

O processo de fixação foi realizado na bancada à temperatura ambiente, e de forma rápida para prevenir a degradação dos microtúbulos dentro das células. A solução de fixação, era sempre preparada de fresco, a partir da solução de Formaldeído a 37% (Calbiochem), sendo diluída para 3.7% em tampão PEM 1x (10 mM PIPES, 2 mM MgCl<sub>2</sub> e 5 mM de EDTA, pH 6,8), pré-aquecido a 37 °C. Aspirou-se o meio, e as células eram sujeitas a três lavagens rápidas com PEM 1x. De seguida, o fixador era adicionado às células, durante 10 min, e as células, por fim, eram lavadas 3 vezes, durante, 5 minutos com tampão PEM 1x.

### **2.6.2 Permeabilização, bloqueio, incubação de anticorpos e montagem dos slides**

Após a fixação procedeu-se à permeabilização das células com 0.5% de TriptonX-100 em PBS 1x durante 10 minutos à temperatura ambiente, e seguiram-se três lavagens com PBS 1x durante 5 minutos. Logo em seguida, as células foram bloqueadas através da incubação, por 30 minutos, com uma solução de 0.05% Tween20 em PBS 1x, 2% FBS e 2% BSA (Bovine Serum Albumin, à temperatura ambiente. Procedeu-se à diluição dos anticorpos primários em ADB (solução de diluição de anticorpos, 1% FBS – 0.05% de Tween20 em PBS 1x) e antes da incubação com os estes, foi feita uma lavagem com a solução 0.05% Tween20 em PBS 1x, durante 5 minutos. Os anticorpos primários (Tabela

2.2) foram adicionados às células, e incubados durante uma hora, à temperatura ambiente, em câmara húmida. As células foram depois sujeitas a mais três lavagens com PBS 1x e uma lavagem com 0.05% Tween20 em PBS 1x, durante 5 min cada. De seguida, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (Tabela 2.3), que é feito contra o animal no qual foi feito o anticorpo primário, foi também previamente diluído em ADB, durante 30 min, em câmara húmida e no escuro. A partir deste momento as lamelas foram, sempre que possível, protegidas da luz. Repetiu-se novamente a mesma sequência de lavagens. Seguidamente, incubou-se as células com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (0.25 $\mu$ g/ $\mu$ l) durante 10 minutos. O DAPI é um marcador fluorescente que se liga a zonas ricas de Adenina-Timidina no DNA, permitindo a sua marcação e visualização ao microscópio. Mais uma vez, foram realizadas três lavagens de 5 minutos com PBS 1x. Por fim, efetuou-se a montagem das lamelas em lâminas de vidro, usando como meio de montagem Prolong. No dia seguinte, as lamelas foram seladas com verniz e observadas ao microscópio Zeiss Axioimager Z2.

**Tabela 2. 2- Lista de Anticorpos usados ao longo do trabalho**

| Anticorpos primários                      | Feito em           | Companhia             | Diluição |
|---|--------------------|-----------------------|----------|
| Monoclonal, $\gamma$ -tubulina<br>(GTU88) | Ratinho<br>(mouse) | Sigma (#T6557)        | 1:100    |
| Monoclonal, $\alpha$ -tubulina<br>(YL1/2) | Ratazana<br>(Rat)  | Serotex (#MCA77G)     | 1:100    |
| Policlonal, anti-giantina                 | Coelho<br>(rabbit) | Biologend (#PRB-114C) | 1:1000   |

**Tabela 2. 3- Lista de Anticorpos secundários usados ao longo do trabalho**

| secundário         | Feito em        | Anti IgG de        | Companhia                       | Diluição |
|--------------------|-----------------|--------------------|---------------------------------|----------|
| AF 594 anti-mouse  | Cabra<br>(Goat) | Ratinho<br>(mouse) | Molecular Probes #<br>A-11005   | 1:2000   |
| AF 488 anti-rat    | Cabra<br>(Goat) | Ratazana<br>(Rat)  | Molecular Probes<br>#A-11034    | 1:5000   |
| AF 594 anti-rabbit | Cabra<br>(Goat) | Coelho<br>(Rabbit) | Molecular Probes<br>IgG #A11037 | 1:1000   |

## **2.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western Blotting***

### **2.7.1 Preparação de lisados proteicos celulares**

Para recolher células em cultura para preparação de extratos proteicos a analisar em SDS-PAGE, aspirou-se o meio, lavaram-se as células com PBS 1x cuidadosamente, e depois adicionou-se Tripsina 1x para haver o destacamento das células em cultura. Quando se observou ao microscópio que as células se encontravam em suspensão, estas foram gentilmente resuspendidas em 1 ml de PBS 1x, e o volume total foi colocado num eppendorf de 2 ml, e sujeito a uma centrifugação a 800 rpm durante 2-3 minutos, idealmente a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e ressuspendeu-se o pellet de células em 1 ml de PBS 1x, e voltou-se a centrifugar, nas mesmas condições. Este passo foi repetido três vezes, de forma a lavar o pellet de células e retirar, ao máximo, a tripsina. Por conseguinte, o pellet de células, era guardado numa arca frigorífica a -20 °C. A partir deste momento, todos os procedimentos seguintes foram efetuados em gelo, de forma a preservar a integridade do extrato proteico.

No dia seguinte, as amostras foram resuspendidas e lisadas com o RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM sodium chloride, 1.0% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, pH 8.0), permanecendo 10 minutos em gelo, para de seguida serem vortexadas, por 1 minuto, de forma a quebrar as membranas. Por fim, as amostras eram centrifugadas durante 2 minutos a 13 000 rpm, idealmente a 4°C, e o sobrenadante, contendo a suspensão proteica, foi colocado num novo eppendorf. O pellet que sobrava,

era sempre guardado a -20 °C. De seguida, a amostra era quantificada, para nos assegurarmos que a mesma concentração proteica era carregada no gel. Para tal, efetuei o ensaio de Bradford ( Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent 5000205). Por fim, era feita uma mix com a amostra, loading buffer (200mM Tris-HCl pH 8, 8% de SDS, 0.4% de azul bromofenol, 40% glicerol e 400mM β-Mercaptoetanol) e o restante em água de forma a termos uma concentração final de 30 µg de proteína num volume final de 35 µl. O loading buffer (Laemmli buffer) contém SDS e β-Mercaptoetanol que vão desnaturar as proteínas e carregá-las negativamente, glicerol que dá peso à amostra fazendo com que a amostra fique no fundo do poço e azul bromofenol que dá cor à amostra e nos dá a informação da migração das proteínas. Imediatamente antes de carregar as amostras no gel, as amostras foram aquecidas a 100°C durante 5 minutos no banho seco para desnaturar as proteínas e foram colocadas no gelo durante 1 minuto.

### **2.7.2 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)**

Os géis de poli(acrilamida) são constituídos por uma rede de polímeros (acrilamida e bis acrilamida) que permitem a migração e a separação de proteínas segundo o seu peso molecular. As proteínas de baixo peso molecular migram mais rapidamente no gel do que as proteínas de alto peso molecular. O gel de acrilamida é dividido em duas partes: gel de concentração e gel de separação. Os géis de proteínas foram preparados de acordo com o descrito em Sambrook & Russel, 2001. Inicialmente, preparou-se o gel de separação, com uma percentagem de acrilamida a 12%, e de seguida preparou-se o gel de concentração com uma percentagem de acrilamida a 5%. As soluções usadas foram 30% acrilamida/bis acrilamida (BioRad), 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) e 1.0 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% SDS (m/v), 10% persulfato de amónia (m/v) e TEMED (BioRad). Os géis de poli(acrilamida) foram montados e corridos no sistema Mini-PROTEANII (Bio-Rad), com pentes de 10 poços e espaçadores de 1 mm, em tampão de corrida 1x (25mM de Tris, 0.19mM de glicina, 0.1% de SDS, pH=8.3). No gel de concentração aplicou-se uma corrente elétrica de 15mA, sendo este valor de corrente duplicado para 30mA no gel de separação. Como marcador de peso molecular usou-se o Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (#26619).

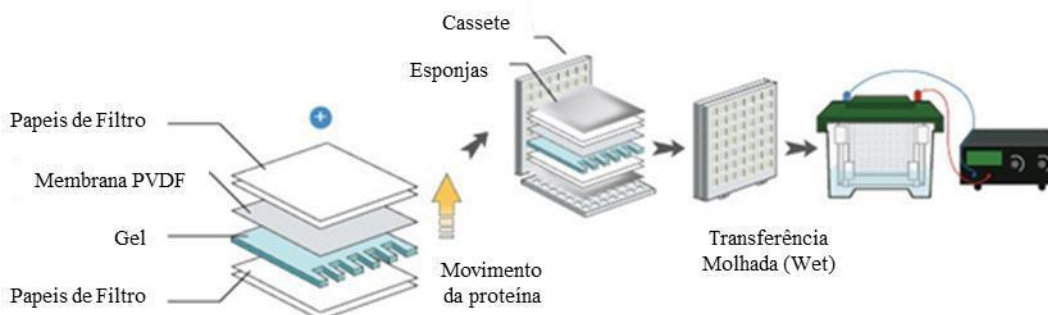
### **2.7.3. Géis corados com Coomassie Blue**

De forma a visualizar as proteínas no gel, usou-se o corante Coomassie Blue R250 (Bio-Rad #1610400). Para corar as proteínas incubou-se o gel com Coomassie Blue (0.25% de Coomassie Blue, 45% Metanol e 10% Ácido acético glacial) durante 4 horas no agitador rotativo de bandeja com agitação suave à temperatura ambiente. Os géis foram descorados na solução descorante (40% de Metanol, 10% de Ácido acético glacial) durante a noite no agitador rotativo de bandeja com agitação suave à temperatura ambiente.

### **2.7.4. Western Blot**

Posteriormente à corrida das amostras no gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF para ficarem acessíveis à deteção por anticorpos. Como a membrana de PVDF é hidrofóbica, esta foi submersa em metanol durante 1 minuto e, de seguida em água destilada durante 5 minutos, tornando-a hidrofílica. Por último, a membrana foi equilibrada em tampão de transferência 1x (25 mM de Tris-HCL, 192 mM de Glicina, 20% de Metanol, pH 8-8.3). Simultaneamente submergiu-se o gel de proteínas em tampão de transferência 1x, assim como, 6 papéis Whatman 3MM e 2 esponjas. O gel e a membrana foram colocados numa cassette entre 6 folhas de papel Whatman 3MM, seguidos de uma esponja (Figura 2.2). As proteínas foram transferidas durante 2 horas a 200mA em tampão de transferência 1x. Após a transferência, retirou-se a membrana e bloqueou-se a membrana em solução de bloqueio (PBS, 0.1% Tween20, 10% de leite magro) durante uma 1 hora. Como a membrana tem grande afinidade para proteínas é necessário bloqueá-la para evitar que o anticorpo se ligue inespecificamente à membrana. Seguiu-se uma lavagem rápida com a solução de lavagem (PBS, 0.1% Tween 20, 1% de leite magro) e incubação com os anticorpos primários (Tabela 2.4) diluídos na solução de lavagem durante uma hora. Lavou-se a membrana 3 vezes durante 5 minutos cada lavagem com solução de lavagem. Incubaram-se os anticorpos secundários (Tabela 2.5) diluídos na solução de lavagem durante uma hora. A membrana foi lavada 3 vezes 10 minutos cada lavagem com a solução de lavagem e uma última com PBS durante 10 minutos. De seguida, a membrana foi incubada durante 1 minuto com uma mistura (50/50) de duas soluções de ECL (Solução I: 1M Tris pH 8.5, 250mM luminol em DMSO

e 90mM ácido p-cumárico em DMSO; Solução II: 1M Tris pH8.5, H<sub>2</sub>O e 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que vão reagir com a enzima HRP que está acoplada ao anticorpo secundário, produzindo um sinal. Este sinal foi detetado, em câmara escura, pelo filme *Hyperfilm* ECL (GE *healthcare Amersham*), usando diversos tempos de exposição.



**Figura 2. 9 - Representação esquemática da montagem da cassete de transferência** pela seguinte ordem: esponja, três folhas de papel Whatman 3 MM, gel, membrana, três folhas de papel Whatman 3 MM e a esponja. Por fim coloca-se a cassete no tanque em que membrana é orientada mais próxima do elétrodo positivo enquanto o gel está situado na direção do elétrodo negativo, desta forma as proteínas carregadas negativamente migrarão para fora do gel e para a membrana Imagem adaptada de:

[http://epgp.inflibnet.ac.in/epgpdata/uploads/epgp\\_content/S001174BS/P001859/M030481/ET/1526878233P11\\_M20\\_ET.pdf](http://epgp.inflibnet.ac.in/epgpdata/uploads/epgp_content/S001174BS/P001859/M030481/ET/1526878233P11_M20_ET.pdf)

**Tabela 2. 4- Anticorpos primários usados em Western-Blot.**

| Anticorpos primários                                 | Feito em        | Companhia         | Diluição |
|--|-----------------|-------------------|----------|
| Monoclonal, $\gamma$ -tubulina (GTU88)               | Ratinho (mouse) | Sigma (#T6557)    | 1:1000   |
| Monoclonal, AntiMob3 clone 16E2 (antiHsMo1//phocein) | Ratinho (Mouse) | Milippore #MABS22 | 1:1000   |

**Tabela 2. 5- Anticorpos secundários usados em Western-Blot.**

| Anticorpo secundário | Feito em        | Anti IgG de     | Companhia                            | Diluição |
|----------------------|-----------------|-----------------|--------------------------------------|----------|
| HRP                  | Coelho (Rabbit) | Ratinho (Mouse) | Jackson Immuno Research Laboratories | 1:1000   |

## **2.8 Extração de DNA**

### **2.8.1 Zebrafish**

De forma a procedermos ao screening da nossa geração de zebrafish, foi feito o corte da cauda de cada animal, e procedeu-se à sua extração. Para tal, em cada tubo de eppendorf que continha a cauda, foi adicionado 200 µl Buffer de extração gDNA mais 200 µl de Proteinase K (10 mg/ml), e deixado a incubar durante a noite a 50-55 °C. No dia seguinte, adicionou-se 400 µl de ETOH 100% e deixou-se incubar no gelo por 30 minutos. De seguida, procedeu-se a uma centrifugação à velocidade máxima, durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante era depois descartado, e era adicionado 1 ml de ETOH 70% gelado (-20°C), e era feito mais um ciclo de centrifugação, à velocidade máxima, durante 5 minutos a 4°C. Mais uma vez, o sobrenadante era descartado, e desta vez o pellet era deixado a secar, se necessário durante a noite, e por fim o pellet era eluído em 20-40µl de TE (ph=8) (10mM Tris-HCL ph=8, 1mM EDTA).

### **2.8.2 Células Humanas**

Para a extração de DNA genómico no caso de células humanas, o procedimento é ligeiramente diferente. As células na placa, são tripsinizadas e resuspendidas em 400 µl de meio de cultura. Recolhemos 100 µl desta suspensão celular, e procedeu-se à sua centrifugação a 2000 g durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante era descartado, o pellet ressuspendido em PBS 1x, e era feito mais um ciclo de centrifugação a 2000g durante 10 minutos, a 4°C. Mais uma vez, o sobrenadante era descartado, e adicionou-se 100 µl de buffer de lise (10mM Tris-HCL ph=8, 10mM EDTA, 0,5% SDS, 10mM NaCl) e 5 µl de Proteinasse K (10 mg/ml), ficando a incubar durante 1 hora a 55 °C, seguido de um

período de incubação de 20 minutos a 95°C. Este último período de incubação serviu para inativar a Proteinase K. De seguida, procedeu-se à precipitação do DNA e para tal, foi adicionado 1 volume de Isopropanol e 10% de Sodium Acetate (3M), e ficou a incubar em gelo durante 10 minutos. Após a incubação, foi feito um ciclo de centrifugação a 15000 g, durante 20 minutos, a 4°C, e o sobrenadante era depois descartado. De seguida, foi adicionado 1 ml de ETOH 70% e centrifugou-se a 15000 g, durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante era descartado, e o pellet de DNA foi deixado a secar, durante 5 minutos a 37°C ou durante 15 minutos à temperatura ambiente. Por fim, o pellet de DNA era eluído em 50 µl de TE (ph=8) (10mM Tris-HCL ph=8, 1mM EDTA).

## 2.9 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Para amplificar (criação de várias cópias) o gene hsMob4 procedeu-se à técnica de PCR usando os primers representados na tabela 2.6. O PCR consiste na criação de várias cópias de uma sequência de DNA, para isso precisa-se de primers e da enzima DNA polimerase. Os primers são desenhados de maneira a serem complementares ao início e ao final da sequência de DNA que se quer amplificar. O PCR divide-se em 3 fases: a desnaturação que se caracteriza pelo aquecimento para a separação da dupla cadeia de DNA, a hibridação que se caracteriza pelo arrefecimento que vai permitir que os primers se liguem à sequência de DNA alvo, e a extensão em que a DNA polimerase adiciona nucleótidos ao lado 3' de cada primer. Para cada reação de PCR, era feita uma mix, com um volume final de 10 µl, de reagentes, conteúdo Buffer 10x, 2mM de dNTPs (Invitrogen), Primer forward e Primer Reverse, a enzima DreamTaq, DNA, e por fim água. As quantidades em que cada reagente foi usado, está representado na Tabela 2.7. De seguida, as amostras são colocadas no termociclador e sujeitas aos ciclos de PCR, descrito na Tabela 2.8. Por fim, o produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1%, no caso de DNA proveniente de células humanas, ou em gel de agarose de 3.5%, no caso de DNA proveniente de *Zebrafish*. A banda correspondente foi extraída e purificada a partir do gel de agarose usando o kit “QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol” (Quiagen #20021).

**Tabela 2. 6- Listagem dos reagentes usados na Mix de PCR, com as respectivas quantidades para Zebrafish e células humanas**

| Reagente       | Quantidade Zebrafish (µL) | Quantidade células humanas (µL) |
|----------------|---------------------------|---------------------------------|
| Buffer 10x     | 1                         | 1                               |
| DNTP's 2mM     | 1                         | 1                               |
| Primer Fw 10   | 0,2                       | 1                               |
| Primer Rv 10   | 0,2                       | 1                               |
| Taq Polimerase | 0,06                      | 0,05                            |
| DNA            | 1                         | 1                               |
| Água           | 6,54                      | 4,95                            |

**Tabela 2. 7- Programa dos ciclos usados, para a amplificação do gene MOB4 por PCR, para Zebrafish e células humanas, respetivamente**

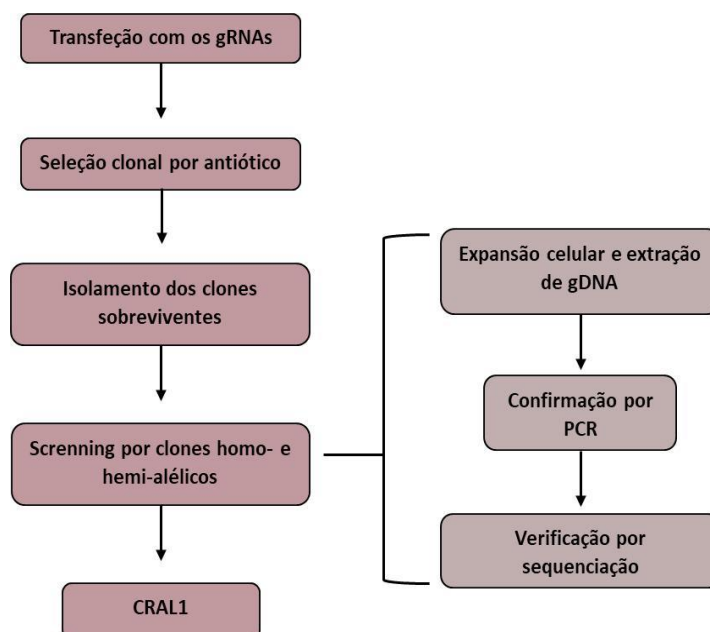
|     | Temperatura (°C) | Tempo |
|-----|------------------|-------|
| 35x | 95               | 5'    |
|     | 95               | 15''  |
|     | 58               | 30''  |
|     | 72               | 20''  |
|     | 72               | 5'    |
|     | 12               | ∞     |

|     | Temperatura (°C) | Tempo |
|-----|------------------|-------|
| 40x | 95               | 1'    |
|     | 95               | 30''  |
|     | 58               | 30''  |
|     | 72               | 2'    |
|     | 72               | 5'    |
|     | 4                | ∞     |

### 3 Resultados em células humanas

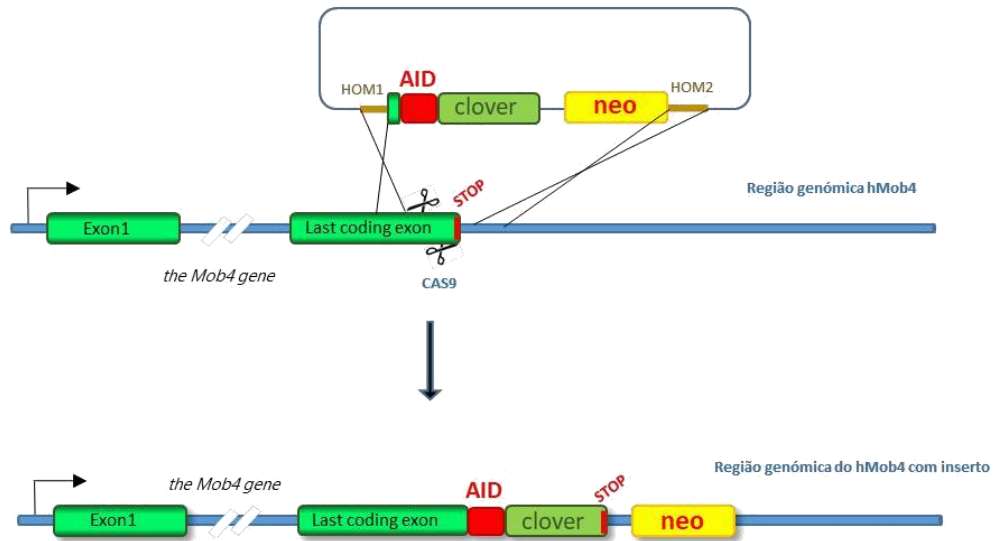
De forma a se identificar a função do gene Mob4/phocein em linhas celulares humanas procedeu-se à construção de mutantes de degradação indutível com recurso à abordagem CRISPr. Para tal, construíram-se os guide RNAs pAL135/Alo-cherry/mob4/phocein e pAL147/mob4-AID clover nero (Tabela 3.1), que foram transfetados nas células. Os guide RNAs continham a cassette de interesse, que será integrada no genoma, mais especificamente no último exão do gene Mob4/phocein, dando origem a uma proteína de degradação indutível (Figura 3.2). De seguida, procedeu-se à seleção dos clones com as respetivas drogas, aos quais deverão ter resistência, sobrevivendo apenas as células que integraram a cassette. A concentração da droga e o tempo a que a linha é submetida a tal tratamento foi anteriormente estipulado. Assim que se tem os clones selecionados, procede-se ao isolamento dos clones, de forma a criar colónias provenientes de uma única célula. Por fim, foi feita a extração de DNA genómico, para o rastreio de clones homo- e hemi-alélicos, por PCR.

Todo o processo descrito (esquematizado 3.2) foi efetuado pela estudante de Doutoramento Inês Baião Santos, que no fim conseguiu isolar um clone homo-alélico para a inserção da cassette na região genómica de interesse, sendo este clone chamado doravante como CRAL1.



**Figura 3. 1-** Esquema do procedimento efetuado na produção de um mutante em linhas celulares humanas, com recurso a CRISPr.

## Estratégia para inserir AID-CLOVER-NEO após o ultimo codão codificante



**Figura 3. 2-** Estratégia de inserção usada, de forma a inserir a cassete de interesse, no último codão codificante da proteína MOB4/phocein.

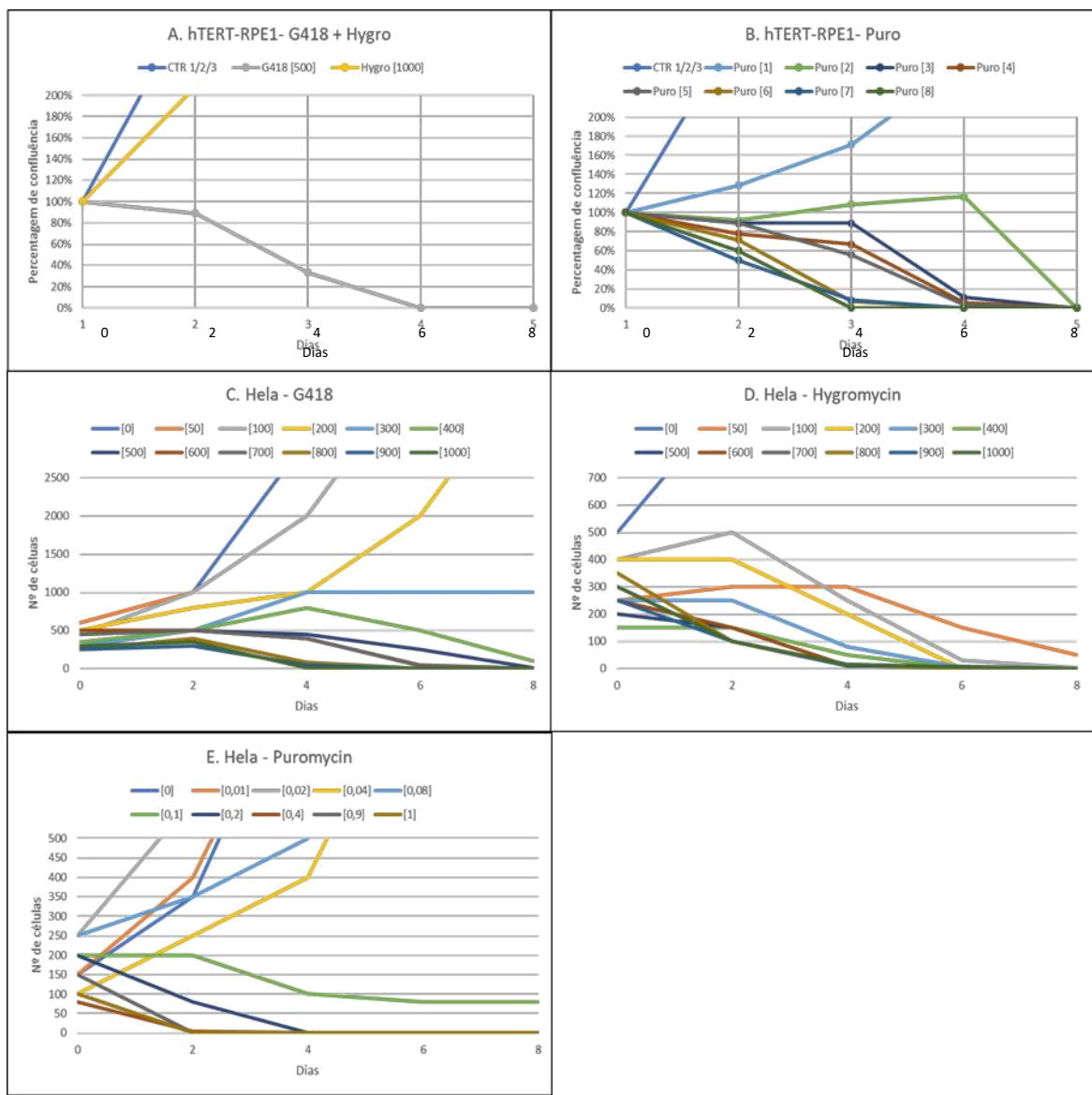
**Tabela 3. 1-** Programa dos ciclos usados, para a amplificação do gene MOB4 por PCR, para Zebrafish e células humanas, respectivamente

| Nome    | Vetor      | Notas   |
|---------|------------|---|
| pAL 135 | AIO-cherry | Guide RNA1 + guide RNA2 para hMob4/phocein, clonado em Bbs1 bsa i sites do vetor all-in-one cherry. |
| pAL 147 | pRN3P      | CRISPr construído em pAL130 com a primeira sequência de PAM mutada, para hMob4                      |
| pAL128  | AIO-cherry | Guide RNA1 para hMob4/phocein clonado em Bbs1 site do vetor all-in-one Cherry.                      |
| pAL130  | pRN3P      | pRN3P com Mob4Hom1-AID-Clover-neo-Mob4Hom2. Cassete de pMK289 . Para crispr de Mob4/phocein.        |

### 3.1 Curva de morte para a linha celular hTERT-RPE1 e Hela

Tendo isolado um clone homo-alélico para o gene Mob4/phocein, quisemos criar mais linhas celulares estáveis, de forma a confirmar que o resultado das nossas experiências, não seriam um artefacto da linha celular HCT-116. Para tal, o primeiro passo para gerar uma linha celular estável, consiste na determinação da concentração ótima de antibiótico para selecionar colónias de células estáveis. Desta forma, uma curva de morte é uma experiência de dose-resposta, onde as células são sujeitas a quantidades crescentes de antibiótico, com fim de determinar a concentração mínima de antibiótico necessária para matar todas as células, num prazo de uma semana. O intervalo de concentrações do antibiótico, foi decidida tendo em conta as doses recomendadas pelo site da Merck (*Antibiotic Kill Curve | Sigma-Aldrich*, n.d.). As linhas celulares usadas foram as hTERT-RPE1 e Hela, com os antibióticos neomicina (G418), Higromicina B e Puromicina

A linha celular hTERT-RPE1, já apresenta resistência ao antibiótico Higromicina B, devido à transfeção da linha celular RPE-340 com o plasmídeo que expressa pGRN145 hTERT (*HTERT RPE-1 ATCC ® CRL-4000<sup>TM</sup> Homo Sapiens Retina, Eye; Pigm*, n.d.). Devido a isso, apenas foi selecionada a concentração máxima deste antibiótico para esta linha.



**Figura 3.3- A- Curva de Morte para a linha celular hTERT-RPE1, com o antibiótico G418 e Hygromicina. B- Curva de Morte para a linha celular hTERT-RPE1, com o antibiótico Puromycin. C - Curva de Morte para a linha celular HeLa, com o antibiótico G418. D- Curva de Morte para a linha celular HeLa, com o antibiótico Hygromycin. E- Curva de Morte para a linha celular HeLa, com o antibiótico Puromycin.**

Ao fim de oito dias para a linha celular hTERT-RPE1, observou-se morte celular total para o antibiótico neomicina, a 500 µg/ml, e para o antibiótico puromicina, a 3 µg/ml (Figura 3.3- A, B). Como esperado para esta linha celular, a concentração máxima de Higromicina B, não levou à sua morte celular, demonstrando que a linha ainda tem resistência (Figura 3.3- A). No caso da linha celular HeLa, ao fim de oito dias, observou-se morte celular total para o antibiótico neomicina, a 700 µg/ml, para o antibiótico

Higromicina B, a 300 µg/ml, e para o antibiótico puromicina, a 0,2 µg/ml (Figura 3.3-C, D, E). Assim, estas concentrações de antibiótico foram selecionadas como sendo a dose ótima.

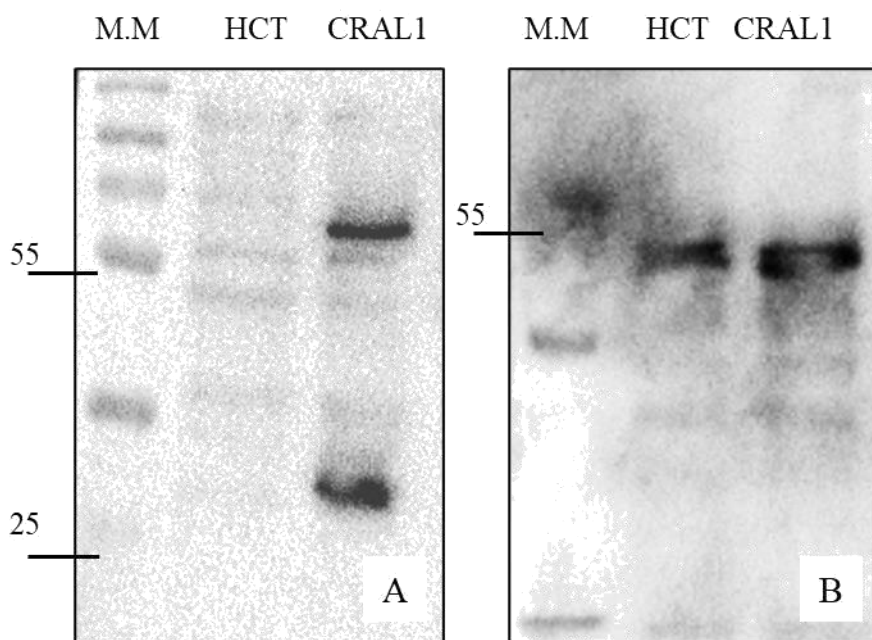
### **3.2 Sequenciação da linha estável CRAL1 indutível**

De modo a prosseguir o procedimento esquematizado na Figura 3.1, após a seleção do clone homo-alélico por PCR (CRAL1), procedeu-se à sua confirmação por sequenciação, de forma a compreender se a inserção da cassette tinha corrido bem, e se esta se encontrava in-frame. Para tal, foi feita a extração de DNA como explicado no ponto 2.8.2, do capítulo Material e Métodos, e enviado para sequenciação para a empresa STAB VIDA.

Aquando da receção das sequências de DNA do clone homo-alélico CRAL1, estas foram alinhadas com as sequências dos guide RNAs. Após a análise da sequenciação, conseguimos concluir que a transfeção foi um sucesso, havendo a integração da cassette no último exão do gene Mob4/phocein, ficando tudo in-frame, resultando num gene de fusão.

### **3.3 Verificação presença de GFP na linha celular CRAL1 por Western-Blot**

A seguir, à confirmação da inserção da cassette por sequenciação, com sucesso, procedeu-se à confirmação a nível proteico, ou seja, verificou-se se a proteína era expressa de acordo com a sequenciação e para tal procedemos à verificação da proteína de fusão resultante por Western-Blot. Desta forma, as células CRAL1 e HCT-116 foram semeadas e o pellet foi recolhido dois dias depois, este foi lizado como explicado no ponto 2.7.1, do capítulo Material e métodos. É conhecido que a proteína Mob4/phocein tem um peso molecular de 27 kb, e a proteína GFP tem um peso molecular de 28 kb, desta forma, é esperado que a proteína de fusão resultante, ronde o peso molecular de 55 kb. O resultado desta análise encontra-se demonstrada no Figura 3.4



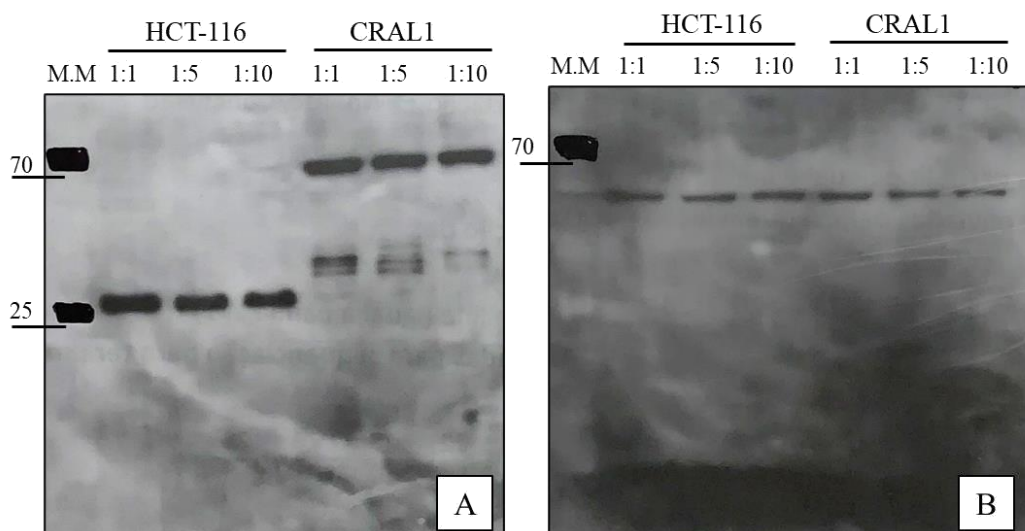
**Figura 3. 4- Análise por Western-Blot da proteína de fusão com GFP resultante. A-** Marcação com anticorpo anti-GFP. B- Marcação com o anticorpo anti-actina.

Com esta análise conseguimos confirmar, que a nível proteico, a técnica de CRISPr também foi um sucesso, pois a nossa proteína de fusão apresenta o peso molecular dentro dos valores que seriam espectáveis.

### **3.4 Verificação da influência da confluência celular nos níveis intracelulares da proteína MOB4/phocein**

De forma a compreender como a proteína MOB4/phocein se comporta dentro da célula, e tendo em conta o que já foi publicado, uma pergunta que queríamos ter resposta, era se a nossa proteína, uma vez que estava envolvida na via Hippo, e por sua vez, esta tinha o seu estado ativo/inativo influenciado pela confluência celular, seria MOB4/phocein também influenciada por este estímulo de confluência. Desta forma, foram preparadas placas, onde foram semeadas concentrações crescentes de células CRAL1 e HCT-116, resultando em 3 placas que eu denominei de, 1:1 (100% de confluência), sendo esta a placa onde já não havia mais espaço para as células crescerem, 1:5 (30% de confluência), neste caso as células tinham espaço para crescer, mas não estavam todas em contacto, e a placa de 1:10 (10% de confluência), onde as células



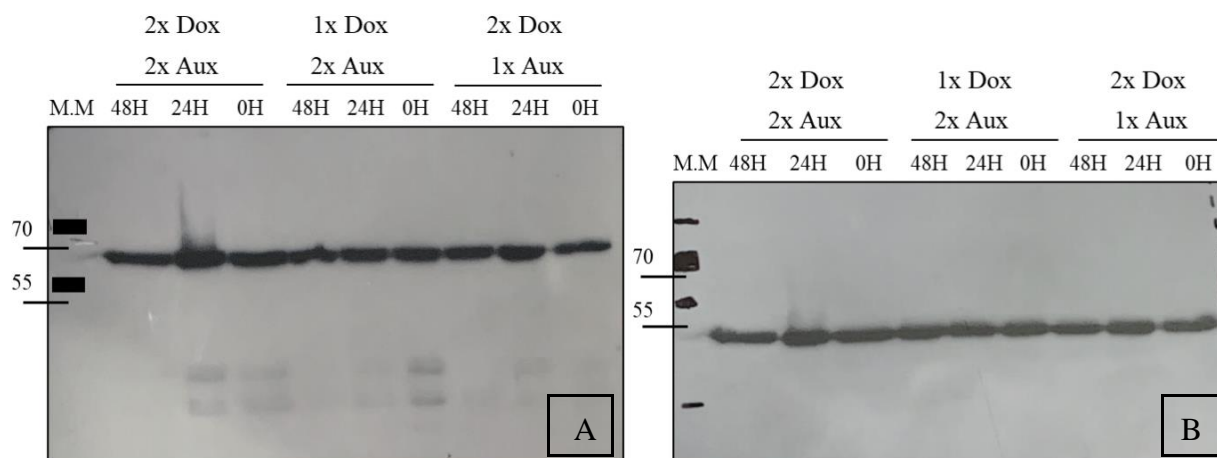


**Figura 3. 6- Resultado da análise por western-blot dos pellet's correspondentes às diferentes confluências.** A- Marcação com o anticorpo 16E2 (1:1000), que marca a proteína MOB4/phocein. B- Marcação com o anticorpo GTU88 (1:1000), que marca a proteína  $\gamma$ -tubulina

### 3.5 Indução da degradação da proteína Mob4/phocein por Doxíciclina e Auxina

Uma vez tendo a confirmação por sequenciação e por western-blot, que a técnica de CRISPr foi um sucesso, o próximo passo, foi o tratamento da linha celular CRAL1, primeiramente com o antibiótico Doxíciclina, que estimulou a produção da proteína vegetal OSTir, aumentando os seus níveis intracelulares, seguido do tratamento com a hormona vegetal Auxina, que em conjunto com a proteína OSTir, possibilita a identificação e degradação total da proteína MOB4/phocein endógena, providenciando assim uma análise rápida do fenótipo resultante. Para tal, primeiramente, esta análise foi feita por recurso a Western-Blot. As células CRAL1 foram plaqueadas e deixadas em cultura por 24 horas. De seguida, foi adicionado o antibiótico Doxíciclina, que atuou durante mais 24 horas. Por fim, a hormona vegetal Auxina foi adicionada, sendo que ficou a atuar por um período de 24 horas e 48 horas. Foi também testado, nesta experiência o uso da concentração recomendada dos antibióticos assim como o uso do dobro da concentração recomendada. A cada 24 horas o meio era mudado para meio fresco com Doxíciclina e/ou Auxina. Desta forma, e de acordo com o que está publicado, seria espectável que a degradação da proteína Mob4/phocein seja rápida, isto é, em questão de

15-20 minutos, e a quando da marcação com anticorpos não seja detetável. O resultado correspondente encontra-se evidenciado na Figura 3.7.



**Figura 3. 7- Resultado da análise por western-blot da indução da degradação da proteína Mob4/phoecin por Doxíciclina e Auxina.** A- Marcação com o anticorpo 16E2 (1:1000), que marca a proteína MOB4/phoecin. B- Marcação com o anticorpo GTU88 (1:1000), que marca a proteína  $\gamma$ -tubulina.

Através desta análise, conseguimos observar que independentemente da concentração ou do tempo a que as células são expostas à Doxíciclina e Auxina, a nossa proteína não é degradada e não sofre qualquer tipo de alteração. Este não era o resultado expectável, tendo em conta que a verificação feita anteriormente demonstrou que a técnica de CRISPr tinha ocorrido com sucesso.

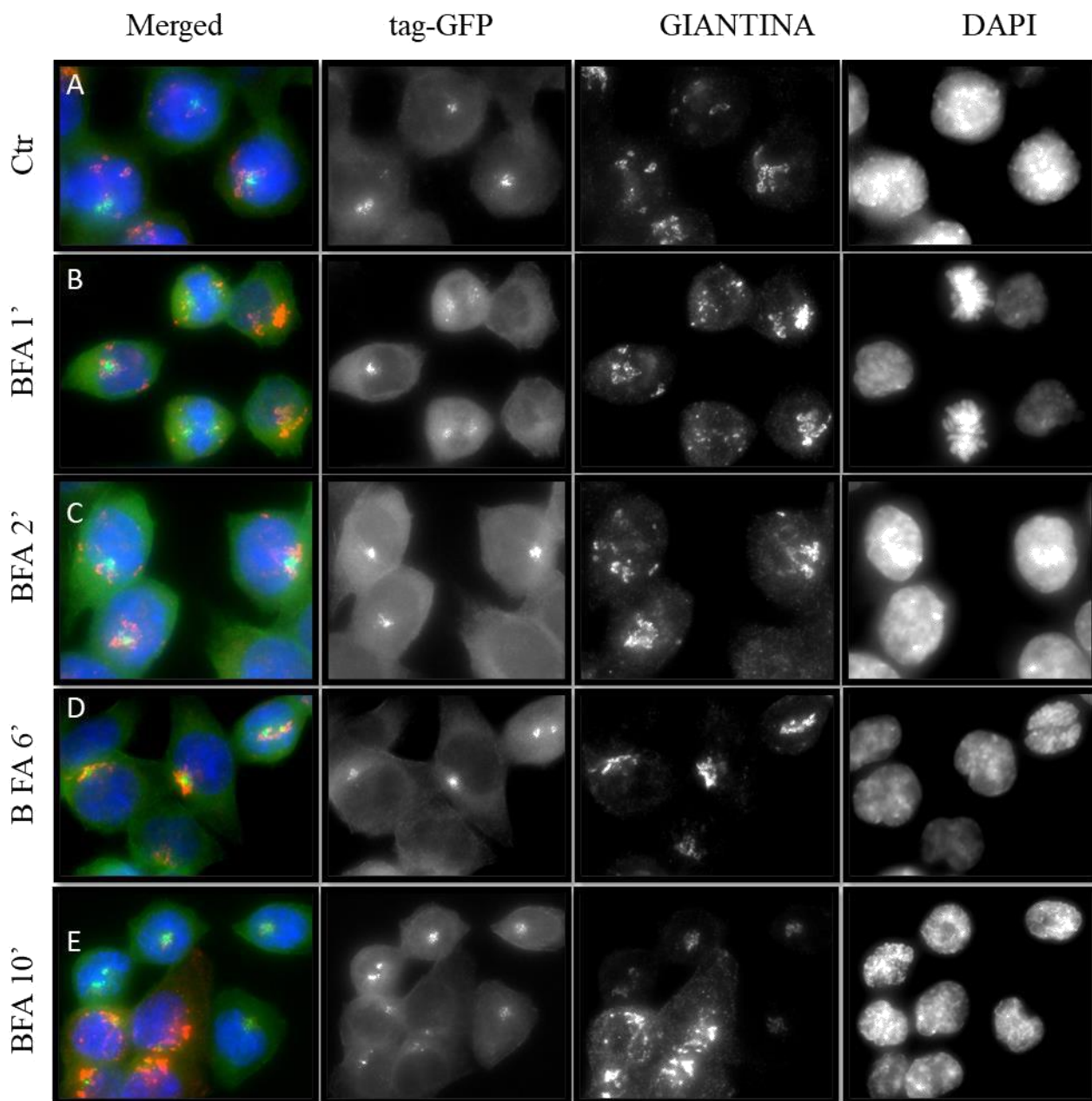
### 3.6 Tratamento da linha celular CRAL1 com a droga Brefaldina A

De acordo com o que está publicado por Baillat et al., 2001, quisemos testar na nossa linha celular, CRAL1, se o mesmo se aplicava. Para tal, as células foram sujeitas a tratamentos com Brefaldina A (BFA) à concentração estipulada e diferentes tempos de exposição à droga. Com isto, iremos inibir a o transporte proteico do reticulo endoplasmático para o complexo de golgi e segundo Baillat et al., 2001, observar uma desagregação do complexo de golgi, que por sua vez leva a uma desagregação, simultânea, da proteína MOB4/phoecin. No nosso caso, a linha celular CRAL1, expressa a proteína de fusão MOB4/phoecin que tem uma tag de GFP, possibilitando assim a

visualização da desagregação ou dispersão da proteína aquando do tratamento da linha com BFA.

Após as células serem sujeitas ao tratamento com BFA à concentração estipulada de 5 µg /ml, durante 1 minuto, 2 minutos, 6 minutos e 10 minutos, estas eram fixadas segundo o protocolo no capítulo 2.6.1, e a técnica de imunofluorescência era aplicada. O resultado encontra-se na Figura 3.8.

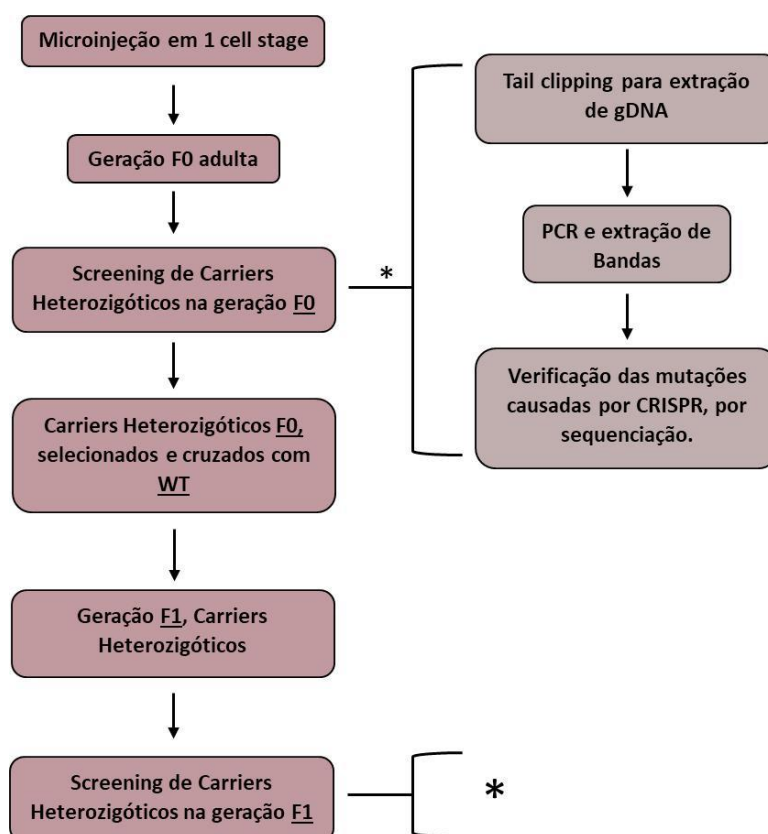
Os nossos resultados parecem demonstrar que o tratamento com a droga BFA, não influencia a degradação ou dispersão da proteína MOB4/phocein, como está publicado (Baillat et al., 2001). Várias razões podem estar a influenciar este resultado, desde ao facto de estarmos a fazer a experiência numa linha celular, as HCT-116, diferente do artigo original, que usaram as células HeLa, ao facto da nossa proteína ter um tag-GFP associado. Em relação ao complexo de golgi, aquando do tratamento com BFA, não aparenta ocorrer qualquer tipo de alteração, independentemente do tempo de exposição à droga.



**Figura 3. 8- Imunofluorescência resultante do tratamento da linha CRAL1 com BFA.** A- Controle, sem adição de BFA. B- Adição de BFA a 5 µg/ml, durante 1 minuto. C- Adição de BFA a 5 µg/ml, durante 2 minutos. D- Adição de BFA a 5 µg/ml, durante 6 minutos. E- Adição de BFA a 5 µg/ml, durante 10 minutos.

#### 4 Resultados Zebrafish

De forma a se identificar a função do gene Mob4/phocean num vertebrado procedeu-se à construção de mutantes nulos em peixe-zebra utilizando uma abordagem CRISPr. Para tal, construíram-se os guide RNAs, que foram injetados em ovos fertilizados no estágio de uma célula. Os embriões que integraram os guide RNAs com sucesso, apresentavam uma marca fenotípica, tornando-se albinos, permitindo desta forma a sua seleção. Após 24 horas, efetuou-se uma verificação preliminar da eficácia dos guide RNAs, através da extração de DNA genómico dos embriões injetados e posteriormente selecionados. Estes foram sujeitos a PCR e verificação da mutação causada através de sequenciação.



**Figura 4. 1 - Esquema do procedimento efetuado no âmbito da produção de um mutante nulo vertebrado para a proteína MOB4/phocean. \* significa a repetição do procedimento.**

No, entretanto, a geração F0, resultante da injeção, foi mantida em condições ideais ao seu desenvolvimento, até chegarem à fase adulta. De seguida, procedeu-se ao rastreio da geração F0, onde o procedimento completo está esquematizado na Figura 4.1.

Os indivíduos que após análise mostraram ter alterações região genómica foram selecionados e doravante chamados de Carriers.

#### **4.1 Rastreio de Heterozigóticos na geração F0**

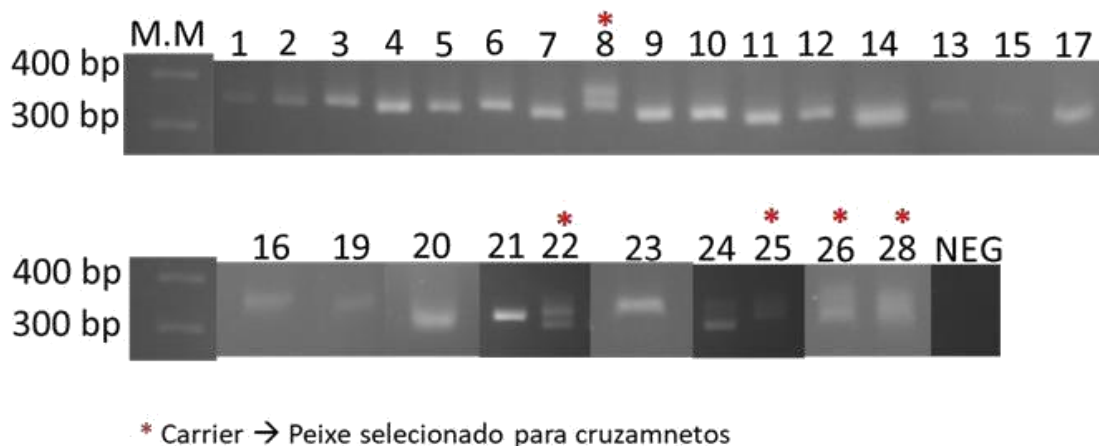
Como explicado anteriormente, e esquematizado na Figura 4.1, o primeiro passo consistiu no Rastreio de Heterozigóticos, na geração F0 adulta. A geração F0 apresentava uma totalidade de vinte e oito peixes-zebra, estando discriminada na Tabela 4.1.

Para se identificar os indivíduos em que tenha ocorrido CRISPr no gene *Mob4/phocean*, realizou-se a amplificação da região genómica por PCR, utilizando os primers InCF94\_ZF\_Ex1\_Fw e InCF94\_ZF\_Ex1\_Rvr e o DNA genómico obtido de células recolhidas da cauda dos indivíduos. Nesta reação é esperado amplificar-se uma banda de 248 pares de base (bp) nos indivíduos selvagens, banda essa que deverá aparecer de tamanho alterado no caso de ter havido alteração da região (ver esquema na Figura 4.1). O produto de PCR é depois corrido em gel de agorose, como demonstrado na figura 4.2, onde uma primeira análise é feita sobre potenciais portadores da mutação, sendo a sua banda extraída e enviada para análise por sequenciação.

Seguindo esta abordagem conseguiu-se identificar onze indivíduos, dos vinte e oito iniciais, que aparentam ter alterações na região genómica, os denominados de carriers. Estes carriers foram enviados para sequenciação de forma a confirmar se realmente existe ou não a alteração desejáveis. Os 11 indivíduos em questão são: 8, 12, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 e 28. Os resultados relativamente à sequenciação estão apresentados no ponto 4.2.

**Tabela 4. 1 Discriminação da geração F0, com o ID atribuído a cada peixe-zebra, o seu sexo, e o respetivo resultado após a seleção e análise por sequenciação.**

| ID do Peixe | Sexo  | Resultado |
|-------------|-------|-----------|
| 1           | Fêmea | WT        |
| 2           | Macho | WT        |
| 3           | Fêmea | WT        |
| 4           | Macho | WT        |
| 5           | Fêmea | WT        |
| 6           | Macho | WT        |
| 7           | Fêmea | WT        |
| 8           | Fêmea | CARRIER   |
| 9           | Macho | WT        |
| 10          | Fêmea | WT        |
| 11          | Fêmea | WT        |
| 12          | Fêmea | WT        |
| 13          | Fêmea | WT        |
| 14          | Fêmea | WT        |
| 15          | Fêmea | WT        |
| 16          | Fêmea | WT        |
| 17          | Macho | WT        |
| 18          | Macho | Falhou    |
| 19          | Macho | WT        |
| 20          | Fêmea | WT        |
| 21          | Macho | WT        |
| 22          | Fêmea | CARRIER   |
| 23          | Fêmea | WT        |
| 24          | Macho | WT        |
| 25          | Fêmea | CARRIER   |
| 26          | Fêmea | CARRIER   |
| 27          | Macho | WT        |
| 28          | Fêmea | CARRIER   |



**Figura 4. 2- Produto de PCR, de toda a geração F0, corrido em gel de agarose a 3,5%. Os peixe-zebra com \* são os selecionados como carriers, após a análise por sequenciação (5.2.2).**

#### **4.2 Análise dos resultados de Sequenciação dos Carriers F0 selecionados.**

Tendo isolado estes onze potenciais carriers, procedemos à extração das bandas, do gel de agarose, usando o kit da QUIAGEN (150) de forma a purificar o DNA de interesse e enviar para sequenciação. Aquando da extração, os DNA's foram sujeitos a análise pelo NanoDrop, de forma a cumprir os requisitos dados pela empresa de sequenciação.

Primeiramente, alinharam-se as sequências de DNA dos onze potenciais carriers com a sequência WT da proteína MOB4/phocein em peixe-zebra, de forma a verificar se ao longo da região genómica havia a mutação desejada. Seguidamente procedemos à análise da sequência proteica para cada uma das sequências. Desta forma, iremos compreender, se o DNA que temos origina uma proteína ainda funcional, ou com o codão de STOP, resultante da mutação provocada por CRISPR, resultando numa proteína MOB4 não funcional.

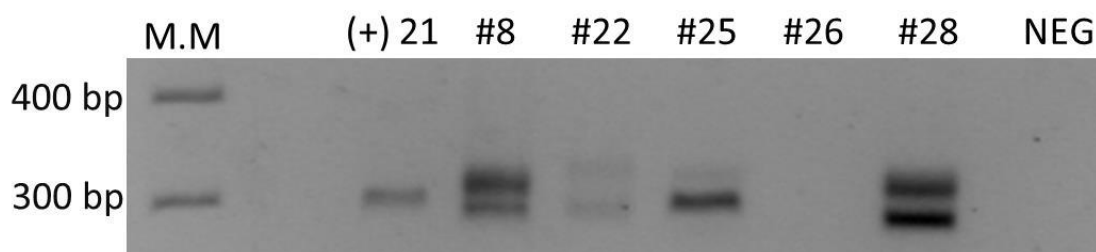
Por fim, após análise, dos onze potenciais carriers, cinco peixe-zebra demonstraram ter o gene com o codão STOP in frame, da região codificante, sendo selecionados como carrier's. Os peixe-zebra selecionados foram o 8, 25, 26 e 28 (consultar Figura 4.2 e Tabela 4.1). Uma vez que os carrier's, em questão, selecionados são todas fêmeas, tivemos que fazer um cruzamento com um Macho WT, de forma a obter descendência mais ampla a nível de machos e fêmeas carrier's.

### 4.3 Rastreo de Heterozigóticos na geração F1

O primeiro passo a tomar após o cruzamento dos cinco carrier's com o peixe-zebra Wild Type, foi verificar a manutenção da mutação na linha germinal. Para tal foram recolhidos 8 embriões, 24 horas após cada cruzamento, sendo sujeitos a extração de DNA genómico, PCR, e corridos em gel de agarose, como apresentado na Figura 4.3.

Como observado na Figura 4.3, conseguimos ver 2 bandas em todos os cruzamentos, indicando que a mutação também se encontrava na linha germinal, passando assim à descendência, sendo este o resultado mais esperado. O DNA correspondente à descendência da fêmea 26 com o macho WT, #26, não conseguimos ter um resultado.

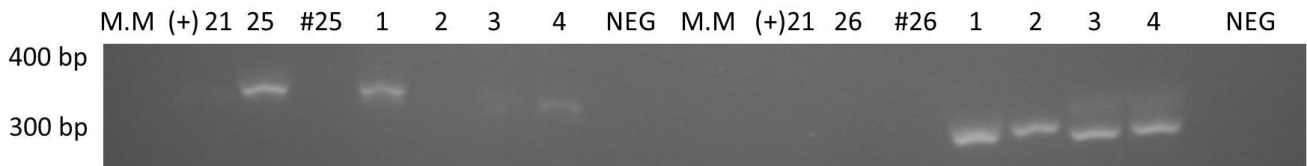
No, entretanto, a geração F1, resultante dos cruzamentos, foi mantida em condições ideais ao seu desenvolvimento, até chegarem à fase adulta. Assim que a geração F1 atingiu a maturação e se encontrava na fase adulta, procedemos novamente ao rastreio (ver esquema da figura 4.1). Nomeamos a geração F1 tendo em conta o seu progenitor.



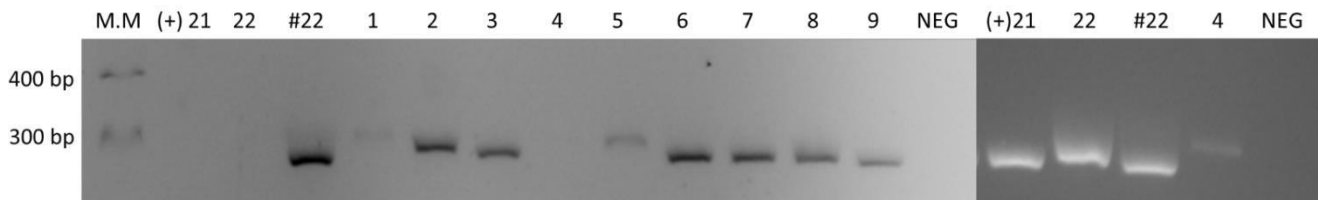
**Figura 4. 3- Produto de PCR dos embriões** resultantes do cruzamento dos 5 carriers com WT, 24 horas após.

Para se identificar os carriers descendentes dos cruzamentos, realizou-se a amplificação da região genómica por PCR, utilizando os primers InCF94\_ZF\_Ex1\_Fw e InCF94\_ZF\_Ex1\_Rvr e o DNA genómico obtido de células recolhidas da cauda dos indivíduos. O produto de PCR é depois corrido em gel de agarose de forma a proceder à

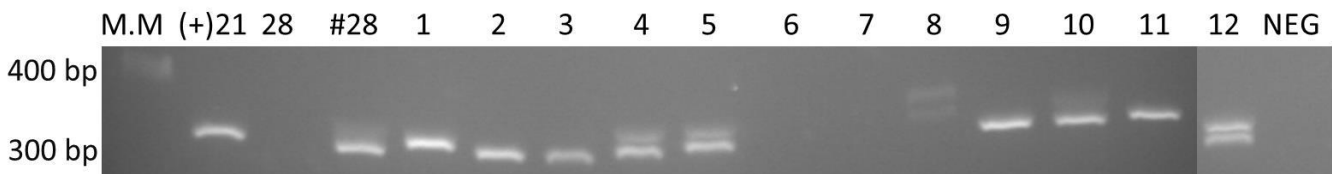
sua análise e seleção. Nas Figuras 4.4, 4.5 e 4.6, respectivamente, podemos ver os respectivos resultados para os cruzamentos.



**Figura 4. 4- Produto de PCR da descendência resultante do cruzamento dos carrier 25 com WT e do carrier 26 com WT.**



**Figura 4. 5- Produto de PCR da descendência resultante do cruzamento dos carrier 22 com WT.**



**Figura 4. 6- Produto de PCR da descendência resultante do cruzamento dos carrier 28 com WT**

Por fim, após análise da descendência F1, para cada um dos cruzamentos, conseguiu-se isolar um total de dez descendentes carriers. Os descendentes carriers selecionados estão explícitos na Tabela 4.2. Como demonstrado, no cruzamento CRISPR 25 X WT, não foi selecionado nenhum descendente, e no cruzamento CRISPR 28 X WT, os DNA's com ID 6 e 7 falharam.

Desta forma, como resultado do Rastreo da geração F1, resultante do cruzamento das fêmeas carriers F0 com Wild Type (WT), conseguimos obter uma geração de carriers mais ampla, obtendo tanto fêmeas como machos carriers. O passo seguinte será fazer o

entrecruzamento destes carriers machos e fêmeas, de forma se obter uma geração F2, que esperemos que dê origem a mutantes nulos para o gene MOB4/phocein que planeado de início.

**Tabela 4. 2- Seleção final dos carriers F1, resultantes do cruzamento dos carriers F0 com WT**

| Cruzamento     | Selecionados | Sexo  |
|----------------|--------------|-------|
| CRISPR 22 X WT | 1            | Fêmea |
|                | 2            | Macho |
|                | 4            | Fêmea |
|                | 5            | Macho |
| CRISPR 25 X WT | -----        | ----- |
| CRISPR 26 X WT | 3            | Fêmea |
|                | 4            | Fêmea |
| CRISPR 28 X WT | 5            | Fêmea |
|                | 8            | Macho |
|                | 10           | Macho |
|                | 12           | Macho |

## 5 Discussão e conclusão

O funcionamento correto da divisão celular é essencial para que o material genético seja transmitido, de forma que uma célula progenitora dê origem a duas células filhas geneticamente idênticas, assegurando a continuidade da vida. No caso deste processo ser comprometido, poderão surgir várias complicações como por exemplo o aparecimento de cancro. No entanto, grande parte dos mecanismos de controlo e execução da divisão celular continuam por ser esclarecidos.

A proteína Mob4 está ainda escassamente estudada, especialmente em humanos. Esta proteína está inserida num complexo proteico, o complexo STRIPAK (Ardestani & Maedler, 2020; Bae et al., 2020; R. Chen et al., 2019; J. Hwang & Pallas, 2014; Kean et al., 2011; J. W. Kim et al., 2020; Kück et al., 2019; Moreno et al., 2001; Seo et al., 2020; Shi et al., 2016; Xie et al., 2020). O STRIPAK está envolvido na regulação de várias vias e processos biológicos essenciais (Ardestani & Maedler, 2020; R. Chen et al., 2019; Goudreault et al., 2009; Kean et al., 2011; J. W. Kim et al., 2020), no entanto o papel da Mob4 nestes não é ainda conhecido; é também desconhecido se a Mob4 poderá atuar fora deste complexo e, se sim, em quais processos estará envolvida. Resultados previamente obtidos no laboratório do Cell Cycle and Cancer Biology Group, onde este projeto foi realizado, mostraram que a Mob4 é uma proteína essencial para a realização da mitose e pode estar envolvida na manutenção e remontagem do Golgi após mitose (dados não publicados).

Ao longo do trabalho teremos como objetivo o estudo da função da proteína Mob4/phocein na regulação da mitose. De forma a cumprir este objetivo iremos recorrer a várias técnicas de biologia molecular, descritas ao longo do trabalho, assim como ao uso de células humanas e *Zebrafish* como modelo de estudo. Com a aplicação das técnicas moleculares que me foram ensinadas, ao longo de todo o ano, que foram aqui descritas, foi-me possível responder a algumas das perguntas e objetivos estipulados para esta dissertação.

O desenvolvimento e criação de uma linhas de células de mamíferos para uma terapêutica recombinante, resume-se geralmente em três etapas: engenharia da célula hospedeira, seleção e screening da linha celular. Após a realização destas três etapas com sucesso, foi possível concluir que primeiramente a linha celular feita pelo laboratório (CRAL1), apresentava ser uma linha estável, e ter a proteína de fusão desejável.

Após o desenvolvimento da linha CRAL1, quisemos ter resposta a uma pergunta simples, que poderia influenciar as experiências futuras, e está era se a confluência das células iria afetar a concentração da nossa proteína a nível intracelular. Uma característica notável da sinalização da via Hippo é o fato de integrar sinais de controle de crescimento, como polaridade celular, adesão e contato, assim como forças mecânicas também afetam a sinalização de Hippo (Gaspar & Tapon, 2014; Halder et al., 2012; Sun & Irvine, 2016; F. X. Yu, Zhao, et al., 2015). Conseguimos concluir que independentemente da confluência das células, os níveis intracelulares de Mob4/phocein, se mantêm, o que sugere que a confluência não afeta os níveis da proteína. Desta forma, apesar do envolvimento de MOB4/phocein na via Hippo, contrariamente ao que está descrito na bibliografia, o estímulo célula-célula não afeta a proteína Mob4/phocein.

Visto que a nossa linha foi desenvolvida pelo mesmo método apresentado por (Natsume et al., 2016), procedemos ao tratamento da linha CRAL1 com o antibiótico Doxíciclina e a hormona Auxina, com as concentrações e tempos indicados no artigo. Observamos, com recurso a wetern-blott e microscopia de imunofluorescência, que com as concentrações e tempos apresentados na bibliografia, a proteína Mob4/phocein não apresentava degradação. Decidimos então aumentar a exposição das células ao antibiótico Doxíciclina e a hormona Auxina, tanto em concentração como em tempo. Observamos, mais uma vez, que independentemente da concentração ou do tempo a que as células são expostas à Doxíciclina e Auxina, a nossa proteína não é degradada e não sofre qualquer tipo de alteração, não sendo este o resultado expectável.

Com o trabalho efetuado em *Zebrafish*, foi possível o isolamento de 11 animais F1 carriers, isto é, portadores da mutação para Mob4/phocein. Estes animais eram portadores da mutação em Heterozigotia, sendo necessário um último cruzamento entre esta geração de forma a originar um mutante nulo para a proteína Mob4/phocein, de forma a analisar os efeitos da ausência desta proteína em vertebrados.



## 6 Bibliografia

- Angus, L., Moleirinho, S., Herron, L., Sinha, A., Zhang, X., Nestrata, M., Dholakia, K., Prystowsky, M. B., Harvey, K. F., Reynolds, P. A., & Gunn-Moore, F. J. (2011). Willin/FRMD6 expression activates the Hippo signaling pathway kinases in mammals and antagonizes oncogenic YAP. *Oncogene* 2012 31:2, 31(2), 238–250. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.224>
- Antibiotic Kill Curve / Sigma-Aldrich.* (n.d.). Retrieved May 21, 2021, from <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/antibiotic-kill-curve.html>
- Ardestani, A., & Maedler, K. (2020). STRIPAK Is a Regulatory Hub Initiating Hippo Signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 45(4), 280–283. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2020.01.005>
- Ata, H., Clark, K. J., & Ekker, S. C. (2016). The zebrafish genome editing toolkit. *Methods in Cell Biology*, 135, 149–170. <https://doi.org/10.1016/BS.MCB.2016.04.023>
- Bae, S. J., Ni, L., & Luo, X. (2020). STK25 suppresses hippo signaling by regulating SAV1-STRIPAK antagonism. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.54863>
- Baillat, G., Moqrich, A., Castets, F., Baude, A., Bailly, Y., Benmerah, A., & Monneron, A. (2001). Molecular cloning and characterization of phocein, a protein found from the Golgi complex to dendritic spines. *Molecular Biology of the Cell*, 12(3), 663–673. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.3.663>
- Bailly, Y. J. R., & Castets, F. (2007). Phocein: A potential actor in vesicular trafficking at Purkinje cell dendritic spines. *The Cerebellum* 2007 6:4, 6(4), 344–352. <https://doi.org/10.1080/14734220701225912>
- Banaszynski, L. A., Chen, L. chun, Maynard-Smith, L. A., Ooi, A. G. L., & Wandless, T. J. (2006). A Rapid, Reversible, and Tunable Method to Regulate Protein Function in Living Cells Using Synthetic Small Molecules. *Cell*, 126(5), 995–1004. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.07.025>
- Barr, F. A., & Gruneberg, U. (2007). Cytokinesis: Placing and Making the Final Cut.

*Cell*, 131(5), 847–860. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.011>

- Baserga, R. (1965). The Relationship of the Cell Cycle to Tumor Growth and Control of Cell Division: A Review. *Cancer Research*, 25, 581–595.
- Baumgartner, R., Poernbacher, I., Buser, N., Hafen, E., & Stocker, H. (2010). The WW Domain Protein Kibra Acts Upstream of Hippo in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 18(2), 309–316.  
<https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2009.12.013/ATTACHMENT/4C76107B-69E1-447B-8060-A163EF470D0A/MMC1.PDF>
- Behan, F. M., Iorio, F., Picco, G., Gonçalves, E., Beaver, C. M., Migliardi, G., Santos, R., Rao, Y., Sassi, F., Pinnelli, M., Ansari, R., Harper, S., Jackson, D. A., McRae, R., Pooley, R., Wilkinson, P., van der Meer, D., Dow, D., Buser-Doepner, C., ... Garnett, M. J. (2019). Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR–Cas9 screens. *Nature* 2019 568:7753, 568(7753), 511–516.  
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1103-9>
- Bergmann, L., Lang, A., Bross, C., Altinluk-Hambüchen, S., Fey, I., Overbeck, N., Stefanski, A., Wiek, C., Kefalas, A., Verhülsdonk, P., Mielke, C., Sohn, D., Stühler, K., Hanenberg, H., Jänicke, R. U., Scheller, J., Reichert, A. S., Ahmadian, M. R., & Piekorz, R. P. (2020). Subcellular Localization and Mitotic Interactome Analyses Identify SIRT4 as a Centrosomally Localized and Microtubule Associated Protein. *Cells* 2020, Vol. 9, Page 1950, 9(9), 1950.  
<https://doi.org/10.3390/CELLS9091950>
- Bettencourt-Dias, M., & Glover, D. M. (2007). Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(6), 451–463. <https://doi.org/10.1038/NRM2180>
- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K. G., & Carroll, D. (2002). Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 161(3), 1169–1175. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/161.3.1169>
- Blanpain, C. (2013). Tracing the cellular origin of cancer. *Nature Cell Biology*, 15(2), 126–134. <https://doi.org/10.1038/NCB2657>
- Bonger, K. M., Chen, L. C., Liu, C. W., & Wandless, T. J. (2011). Small-molecule displacement of a cryptic degron causes conditional protein degradation. *Nature*

- Chemical Biology* 2011 7:8, 7(8), 531–537. <https://doi.org/10.1038/nchembio.598>
- Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J., & Forman, D. (2012). Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *The Lancet. Oncology*, 13(8), 790–801. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70211-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70211-5)
- Budirahardja, Y., & Gönczy, P. (2009). Coupling the cell cycle to development. *Development*, 136(17), 2861–2872. <https://doi.org/10.1242/dev.021931>
- Burkard, M. E., Maciejowski, J., Rodriguez-Bravo, V., Repka, M., Lowery, D. M., Clauser, K. R., Zhang, C., Shokat, K. M., Carr, S. A., Yaffe, M. B., & Jallepalli, P. V. (2009). Plk1 self-organization and priming phosphorylation of HsCYK-4 at the spindle midzone regulate the onset of division in human cells. *PLoS Biology*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000111>
- Casem, M. L. (2016). Case Studies in Cell Biology. In *Case Studies in Cell Biology* (1st ed). Elsevier Inc.
- Chan, S. W., Lim, C. J., Chong, Y. F., Pobbati, A. V., Huang, C., & Hong, W. (2011). Hippo Pathway-independent Restriction of TAZ and YAP by Angiomotin \*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(9), 7018–7026. <https://doi.org/10.1074/JBC.C110.212621>
- Chen, M., Zhang, H., Shi, Z., Li, Y., Zhang, X., Gao, Z., Zhou, L., Ma, J., Xu, Q., Guan, J., Cheng, Y., Jiao, S., & Zhou, Z. (2018). The MST4-MOB4 complex disrupts the MST1-MOB1 complex in the Hippo-YAP pathway and plays a pro-oncogenic role in pancreatic cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(37), 14455–14469. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA118.003279>
- Chen, R., Xie, R., Meng, Z., Ma, S., & Guan, K. L. (2019). STRIPAK integrates upstream signals to initiate the Hippo kinase cascade. *Nature Cell Biology* 2019 21:12, 21(12), 1565–1577. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0426-y>
- Chung, H. K., Jacobs, C. L., Huo, Y., Yang, J., Krumm, S. A., Plemper, R. K., Tsien, R. Y., & Lin, M. Z. (2015). Tunable and reversible drug control of protein production via a self-excising degron. *Nature Chemical Biology* 2015 11:9, 11(9), 713–720. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1869>

- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, *339*(6121), 819–823. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1231143/SUPPL\\_FILE/PAPV2.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1231143/SUPPL_FILE/PAPV2.PDF)
- Dahlem, T. J., Hoshijima, K., Jurynek, M. J., Gunther, D., Starker, C. G., Locke, A. S., Weis, A. M., Voytas, D. F., & Grunwald, D. J. (2012). Simple Methods for Generating and Detecting Locus-Specific Mutations Induced with TALENs in the Zebrafish Genome. *PLOS Genetics*, *8*(8), e1002861. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1002861>
- Dai, X., She, P., Chi, F., Feng, Y., Liu, H., Jin, D., Zhao, Y., Guo, X., Jiang, D., Guan, K. L., Zhong, T. P., & Zhao, B. (2013). Phosphorylation of Angiomotin by Lats1/2 Kinases Inhibits F-actin Binding, Cell Migration, and Angiogenesis \*. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(47), 34041–34051. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.518019>
- Dickson, L. J., Liu, S., & Storrie, B. (2020). Rab6 is required for rapid, cisternal-specific, intra-Golgi cargo transport. *Scientific Reports 2020 10:1*, *10*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73276-w>
- Duffy, K. T., McAleer, M. F., Davidson, W. R., Kari, L., Kari, C., Liu, C. G., Farber, S. A., Cheng, K. C., Mest, J. R., Wickstrom, E., Dicker, A. P., & Rodeck, U. (2005). Coordinate control of cell cycle regulatory genes in zebrafish development tested by cyclin D1 knockdown with morpholino phosphorodiamidates and hydroxypropyl-phosphono peptide nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, *33*(15), 4914–4921. <https://doi.org/10.1093/nar/gki799>
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., & Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature 2011 474:7350*, *474*(7350), 179–183. <https://doi.org/10.1038/nature10137>
- Fang, C. T., Kuo, H. H., Pan, T. S., Yu, F. C., & Yih, L. H. (2016). HSP70 regulates the function of mitotic centrosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *73*(20), 3949–3960. <https://doi.org/10.1007/S00018-016-2236-8/FIGURES/6>
- Faust, D., Al-Butmeh, F., Linz, B., & Dietrich, C. (2012). Involvement of the

- transcription factor FoxM1 in contact inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 426(4), 659–663.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.09.013>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386. <https://doi.org/10.1002/IJC.29210>
- Florindo, C. (2004). *Estudo dos genes humanos tipo Mob : hsMob4A e hsMob4B: Vol. Doutoramen*. Nova de Lisboa.
- Friedberg, E. C. (2003). DNA damage and repair. *Nature*, 421(6921), 436–440.  
<https://doi.org/10.1038/NATURE01408>
- Frost, A., Elgort, M. G., Brandman, O., Ives, C., Collins, S. R., Miller-Vedam, L., Weibezahn, J., Hein, M. Y., Poser, I., Mann, M., Hyman, A. A., & Weissman, J. S. (2012). Functional repurposing revealed by comparing *S. pombe* and *S. cerevisiae* genetic interactions. *Cell*, 149(6), 1339–1352.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.04.028/ATTACHMENT/40475839-33C1-4630-BEC3-80C238A482DA/MMC3.ZIP>
- Gaspar, P., & Tapon, N. (2014). Sensing the local environment: actin architecture and Hippo signalling. *Current Opinion in Cell Biology*, 31, 74–83.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.09.003>
- Gergely, F. (2002). Centrosomal TACCtics. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 24(10), 915–925.  
<https://doi.org/10.1002/BIES.10162>
- Gilbert, M. J. H., Zerulla, T. C., & Tierney, K. B. (2014). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of aging and exercise: Physical ability and trainability decrease with age. *Experimental Gerontology*, 50(1), 106–113.  
<https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2013.11.013>
- Giotti, B., Joshi, A., & Freeman, T. C. (2017). Meta-analysis reveals conserved cell cycle transcriptional network across multiple human cell types. *BMC Genomics*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3435-2>

- Glover, D. M., Gonzalez, C., & Raff, J. W. (1993). The centrosome. *Scientific American*, 268(6), 62–68. <https://doi.org/10.1038/SCIENTIFICAMERICAN0693-62>
- Godinho, S. A., & Pellman, D. (2014). Causes and consequences of centrosome abnormalities in cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1650). <https://doi.org/10.1098/RSTB.2013.0467>
- Gönczy, P. (2012). Towards a molecular architecture of centriole assembly. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(7), 425–435. <https://doi.org/10.1038/NRM3373>
- Gonzales, A. P. W., & Joanna Yeh, J. R. (2014). Cas9-Based Genome Editing in Zebrafish. *Methods in Enzymology*, 546(C), 377–413. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801185-0.00018-0>
- Goudreault, M., D'Ambrosio, L. M., Kean, M. J., Mullin, M. J., Larsen, B. G., Sanchez, A., Chaudhry, S., Chen, G. I., Sicheri, F., Nesvizhskii, A. I., Aebersold, R., Raught, B., & Gingras, A. C. (2009). A PP2A phosphatase high density interaction network identifies a novel striatin-interacting phosphatase and kinase complex linked to the cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) protein. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 8(1), 157–171. <https://doi.org/10.1074/MCP.M800266-MCP200>
- Goujon, A., Colom, A., Straková, K., Mercier, V., Mahecic, D., Manley, S., Sakai, N., Roux, A., & Matile, S. (2019). Mechanosensitive Fluorescent Probes to Image Membrane Tension in Mitochondria, Endoplasmic Reticulum, and Lysosomes. *Journal of the American Chemical Society*, 141(8), 3380–3384. [https://doi.org/10.1021/JACS.8B13189/SUPPL\\_FILE/JA8B13189\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/JACS.8B13189/SUPPL_FILE/JA8B13189_SI_001.PDF)
- Guha, T. K., Wai, A., & Hausner, G. (2017). Programmable Genome Editing Tools and their Regulation for Efficient Genome Engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 15, 146–160. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2016.12.006>
- Gundogdu, R., & Hergovich, A. (2019). MOB (Mps one Binder) Proteins in the Hippo Pathway and Cancer. *Cells 2019, Vol. 8, Page 569*, 8(6), 569. <https://doi.org/10.3390/CELLS8060569>

- Guzzo, R. M., Sevinc, S., Salih, M., & Tuana, B. S. (2004). A novel isoform of sarcolemmal membrane-associated protein (SLMAP) is a component of the microtubule organizing centre. *Journal of Cell Science*, *117*(11), 2271–2281. <https://doi.org/10.1242/JCS.01079>
- Halder, G., Dupont, S., & Piccolo, S. (2012). Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *13*(9), 591–600. <https://doi.org/10.1038/nrm3416>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>
- Hart, T., Chandrashekhar, M., Aregger, M., Steinhart, Z., Brown, K. R., MacLeod, G., Mis, M., Zimmermann, M., Fradet-Turcotte, A., Sun, S., Mero, P., Dirks, P., Sidhu, S., Roth, F. P., Rissland, O. S., Durocher, D., Angers, S., & Moffat, J. (2015). High-Resolution CRISPR Screens Reveal Fitness Genes and Genotype-Specific Cancer Liabilities. *Cell*, *163*(6), 1515–1526. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.11.015>
- Harvey, K. F., Zhang, X., & Thomas, D. M. (2013). The Hippo pathway and human cancer. *Nature Reviews Cancer* *2013 13:4*, *13*(4), 246–257. <https://doi.org/10.1038/nrc3458>
- Hauri, S., Wepf, A., Van Drogen, A., Varjosalo, M., Tapon, N., Aebersold, R., & Gstaiger, M. (2013). Interaction proteome of human Hippo signaling: modular control of the co-activator YAP1. *Molecular Systems Biology*, *9*(1), 713. <https://doi.org/10.1002/MSB.201304750>
- Hergovich, A., Bichsel, S. J., & Hemmings, B. A. (2005). Human NDR Kinases Are Rapidly Activated by MOB Proteins through Recruitment to the Plasma Membrane and Phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(18), 8259–8272. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.18.8259-8272.2005>
- Hergovich, A., Schmitz, D., & Hemmings, B. A. (2006). The human tumour suppressor LATS1 is activated by human MOB1 at the membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *345*(1), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.244>
- Holdgaard, S. G., Cianfanelli, V., Pupo, E., Lambrugh, M., Lubas, M., Nielsen, J. C.,

- Eibes, S., Maiani, E., Harder, L. M., Wesch, N., Foged, M. M., Maeda, K., Nazio, F., de la Ballina, L. R., Dötsch, V., Brech, A., Frankel, L. B., Jäättelä, M., Locatelli, F., ... Cecconi, F. (2019). Selective autophagy maintains centrosome integrity and accurate mitosis by turnover of centriolar satellites. *Nature Communications* 2019 10:1, 10(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12094-9>
- Holland, A. J., Fachinetti, D., Han, J. S., & Cleveland, D. W. (2012). Inducible, reversible system for the rapid and complete degradation of proteins in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(49), E3350–E3357. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1216880109/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Holtzman, N. G., Kathryn Iovine, M., Liang, J. O., & Morris, J. (2016). Learning to fish with genetics: A primer on the vertebrate model *Danio rerio*. *Genetics*, 203(3), 1069–1089. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.116.190843>
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Tarrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503. <https://doi.org/10.1038/NATURE12111>
- Hruscha, A., Krawitz, P., Rechenberg, A., Heinrich, V., Hecht, J., Haass, C., & Schmid, B. (2013). Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, 140(24), 4982–4987. <https://doi.org/10.1242/DEV.099085>
- hTERT RPE-1 ATCC*® *CRL-4000*<sup>TM</sup> *Homo sapiens Retina, eye; pigm.* (n.d.). Retrieved May 21, 2021, from <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4000.aspx#characteristics>
- Huang, Y., Yao, Y., Xu, H. Z., Wang, Z. G., Lu, O., & Dai, W. (2009). Defects in chromosome congression and mitotic progression in KIF18A-deficient cells are partly mediated through impaired functions of CENP-E. <https://doi.org/10.4161/Cc.8.16.9366>, 8(16), 2643–2649.

<https://doi.org/10.4161/CC.8.16.9366>

- Hwang, J., & Pallas, D. C. (2014). STRIPAK complexes: Structure, biological function, and involvement in human diseases. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *47*(1), 118–148. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.11.021>
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J. R. J., & Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology* *2013 31:3*, *31*(3), 227–229. <https://doi.org/10.1038/nbt.2501>
- IL, C., & RC, G. (1963). Evidence for an essentially constant duration of DNA synthesis in renewing epithelia of the adult mouse. *The Journal of Cell Biology*, *18*(1), 31–40. <https://doi.org/10.1083/JCB.18.1.31>
- Irion, U., Krauss, J., & Nüsslein-Volhard, C. (2014). Precise and efficient genome editing in zebrafish using the CRISPR/Cas9 system. *Development*, *141*(24), 4827–4830. <https://doi.org/10.1242/DEV.115584>
- Iwamoto, M., Björklund, T., Lundberg, C., Kirik, D., & Wandless, T. J. (2010). A General Chemical Method to Regulate Protein Stability in the Mammalian Central Nervous System. *Chemistry & Biology*, *17*(9), 981–988. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2010.07.009>
- Jao, L. E., Wente, S. R., & Chen, W. (2013). Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(34), 13904–13909. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1308335110/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Kean, M. J., Ceccarelli, D. F., Goudreault, M., Sanches, M., Tate, S., Larsen, B., Gibson, L. C. D., Derry, W. B., Scott, I. C., Pelletier, L., Baillie, G. S., Sicheri, F., & Gingras, A. C. (2011). Structure-function analysis of core STRIPAK proteins: A signaling complex implicated in Golgi polarization. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(28), 25065–25075. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.214486/ATTACHMENT/7D7028E4-959C-475B-8FCC-5B5A5C7AE803/MMC1.PDF>
- Khan, F. R., & Alhewairini, S. S. (2018). Zebrafish (*Danio rerio*) as a Model Organism. *Current Trends in Cancer Management*.

<https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.81517>

- Kim, J. W., Berrios, C., Kim, M., Schade, A. E., Adelmant, G., Yeerna, H., Damato, E., Iniguez, A. B., Florens, L., Washburn, M. P., Stegmaier, K., Gray, N. S., Tamayo, P., Gjoerup, O., Marto, J. A., Decaprio, J., & Hahn, W. C. (2020). STRIPAK directs PP2A activity toward MAP4K4 to promote oncogenic transformation of human cells. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.53003>
- Kim, M., Kim, M., Lee, S., Kuninaka, S., Saya, H., Lee, H., Lee, S., & Lim, D. S. (2013). cAMP/PKA signalling reinforces the LATS–YAP pathway to fully suppress YAP in response to actin cytoskeletal changes. *The EMBO Journal*, 32(11), 1543–1555. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2013.102>
- Kishi, S., Bayliss, P. E., Uchiyama, J., Koshimizu, E., Qi, J., Nanjappa, P., Imamura, S., Islam, A., Neuberg, D., Amsterdam, A., & Roberts, T. M. (2008). The Identification of Zebrafish Mutants Showing Alterations in Senescence-Associated Biomarkers. *PLOS Genetics*, 4(8), e1000152. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1000152>
- Kishi, S., Slack, B. E., Uchiyama, J., & Zhdanova, I. V. (2009). Zebrafish as a Genetic Model in Biological and Behavioral Gerontology: Where Development Meets Aging in Vertebrates – A Mini-Review. *Gerontology*, 55(4), 430–441. <https://doi.org/10.1159/000228892>
- Kok, F. O., Shin, M., Ni, C. W., Gupta, A., Grosse, A. S., vanImpel, A., Kirchmaier, B. C., Peterson-Maduro, J., Kourkoulis, G., Male, I., DeSantis, D. F., Sheppard-Tindell, S., Ebarasi, L., Betsholtz, C., Schulte-Merker, S., Wolfe, S. A., & Lawson, N. D. (2015). Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Developmental Cell*, 32(1), 97–108. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2014.11.018>
- Kouranova, E., Forbes, K., Zhao, G., Warren, J., Bartels, A., Wu, Y., & Cui, X. (2016). CRISPRs for Optimal Targeting: Delivery of CRISPR Components as DNA, RNA, and Protein into Cultured Cells and Single-Cell Embryos. *Human Gene Therapy*, 27(6), 464–475. <https://doi.org/10.1089/HUM.2016.009>
- Kubota, T., Nishimura, K., Kanemaki, M. T., & Donaldson, A. D. (2013). The Elg1 Replication Factor C-like Complex Functions in PCNA Unloading during DNA

Replication. *Molecular Cell*, 50(2), 273–280.

<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2013.02.012>

Küick, U., Radchenko, D., & Teichert, I. (2019). STRIPAK, a highly conserved signaling complex, controls multiple eukaryotic cellular and developmental processes and is linked with human diseases. *Biological Chemistry*, 400(8), 1005–1022. [https://doi.org/10.1515/HSZ-2019-0173/ASSET/GRAPHIC/J\\_HSZ-2019-0173\\_FIG\\_005.JPG](https://doi.org/10.1515/HSZ-2019-0173/ASSET/GRAPHIC/J_HSZ-2019-0173_FIG_005.JPG)

Lambrus, B. G., Uetake, Y., Clutario, K. M., Daggubati, V., Snyder, M., Sluder, G., & Holland, A. J. (2015). P53 protects against genome instability following centriole duplication failure. *Journal of Cell Biology*, 210(1), 63–77. <https://doi.org/10.1083/JCB.201502089/VIDEO-6>

Leung, C. Y., & Zernicka-Goetz, M. (2013). Angiomotin prevents pluripotent lineage differentiation in mouse embryos via Hippo pathway-dependent and -independent mechanisms. *Nature Communications* 2013 4:1, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms3251>

Li, M., Zhao, L., Page-McCaw, P. S., & Chen, W. (2016). Zebrafish Genome Engineering Using the CRISPR–Cas9 System. *Trends in Genetics*, 32(12), 815–827. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2016.10.005>

Liu, J., Zhou, Y., Qi, X., Chen, J., Chen, W., Qiu, G., Wu, Z., & Wu, N. (2017). CRISPR/Cas9 in zebrafish: an efficient combination for human genetic diseases modeling. *Human Genetics*, 136(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/S00439-016-1739-6/TABLES/1>

Luca, F. C., & Winey, M. (1998). Mob1, an essential yeast gene required for completion of mitosis and maintenance of ploidy. *Molecular Biology of the Cell*, 9(1), 29–46. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.1.29>

Ma, D., & Liu, F. (2015). Genome Editing and Its Applications in Model Organisms. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 13(6), 336–344. <https://doi.org/10.1016/J.GPB.2015.12.001>

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823–826.

[https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1232033/SUPPL\\_FILE/MALI.SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1232033/SUPPL_FILE/MALI.SM.PDF)

Maugeri-Saccà, M., & De Maria, R. (2018). The Hippo pathway in normal development and cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, *186*, 60–72.

<https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2017.12.011>

McEwen, B. F., Chan, G. K. T., Zubrowski, B., Savoian, M. S., Sauer, M. T., & Yen, T. J. (2001). CENP-E is essential for reliable bioriented spindle attachment, but chromosome alignment can be achieved via redundant mechanisms in mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*, *12*(9), 2776–2789.

<https://doi.org/10.1091/MBC.12.9.2776/ASSET/IMAGES/LARGE/MK0911609010.JPG>

Meng, Z., Moroishi, T., & Guan, K. L. (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes & Development*, *30*(1), 1–17.

<https://doi.org/10.1101/GAD.274027.115>

Meng, Z., Moroishi, T., Mottier-Pavie, V., Plouffe, S. W., Hansen, C. G., Hong, A. W., Park, H. W., Mo, J. S., Lu, W., Lu, S., Flores, F., Yu, F. X., Halder, G., & Guan, K. L. (2015). MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway. *Nature Communications* *2015 6:1*, *6*(1), 1–13.

<https://doi.org/10.1038/ncomms9357>

Moreno, C. S., Lane, W. S., & Pallas, D. C. (2001). A Mammalian Homolog of Yeast MOB1 is Both a Member and a Putative Substrate of Striatin Family-Protein Phosphatase 2A Complexes. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(26), 24253–24260. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102398200>

Natsume, T., Kiyomitsu, T., Saga, Y., & Kanemaki, M. T. (2016). Rapid Protein Depletion in Human Cells by Auxin-Inducible Degron Tagging with Short Homology Donors. *Cell Reports*, *15*(1), 210–218.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.001>

Neklesa, T. K., Tae, H. S., Schneekloth, A. R., Stulberg, M. J., Corson, T. W., Sundberg, T. B., Raina, K., Holley, S. A., & Crews, C. M. (2011). Small-molecule hydrophobic tagging–induced degradation of HaloTag fusion proteins. *Nature Chemical Biology* *2011 7:8*, *7*(8), 538–543. <https://doi.org/10.1038/nchembio.597>

Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H., Kakimoto, T., & Kanemaki, M. (2009). An

- auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nature Methods* 2009 6:12, 6(12), 917–922. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1401>
- Nishimura, K., & Kanemaki, M. T. (2014). Rapid Depletion of Budding Yeast Proteins via the Fusion of an Auxin-Inducible Degron (AID). *Current Protocols in Cell Biology*, 64, 20.9.1-20.9.16. <https://doi.org/10.1002/0471143030.CB2009S64>
- Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental Cell*, 19(4), 491–505. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.011>
- Park, A., Won, S. T., Pentecost, M., Bartkowski, W., & Lee, B. (2014). CRISPR/Cas9 Allows Efficient and Complete Knock-In of a Destabilization Domain-Tagged Essential Protein in a Human Cell Line, Allowing Rapid Knockdown of Protein Function. *PLOS ONE*, 9(4), e95101. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0095101>
- Porteus, M. H. (2015). Towards a new era in medicine: therapeutic genome editing. *Genome Biology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S13059-015-0859-Y>
- Porteus, M. H., & Baltimore, D. (2003). Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science*, 300(5620), 763. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1078395>
- Presley, J. F., Smith, C., Hirschberg, K., Miller, C., Cole, N. B., Zaal, K. J. M., & Lippincott-Schwartz, J. (1998). Golgi membrane dynamics. *Molecular Biology of the Cell*, 9(7), 1617–1626. <https://doi.org/10.1091/MBC.9.7.1617/ASSET/IMAGES/LARGE/MK0780644009.JPG>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2013.143>
- Ratner, H. K., Sampson, T. R., & Weiss, D. S. (2016). Overview of CRISPR–Cas9 Biology. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(12), pdb.top088849. <https://doi.org/10.1101/PDB.TOP088849>
- Reddy, B. V. V. G., & Irvine, K. D. (2013). Regulation of Hippo Signaling by EGFR-MAPK Signaling through Ajuba Family Proteins. *Developmental Cell*, 24(5), 459–471.

<https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2013.01.020/ATTACHMENT/05E3B1CD-8780-4795-9133-EA615D83E4F2/MMC1.PDF>

Rossi, A., Kontarakis, Z., Gerri, C., Nolte, H., Hölper, S., Krüger, M., & Stainier, D. Y. R. (2015). Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*, *524*(7564), 230–233.  
<https://doi.org/10.1038/NATURE14580>

Sandal, T. (2002). Molecular Aspects of the Mammalian Cell Cycle and Cancer. *The Oncologist*, *7*(1), 73–81. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.7-1-73>

Sasaki, T., & Kishi, S. (2013). Molecular and chemical genetic approaches to developmental origins of aging and disease in zebrafish. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1832*(9), 1362–1370. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2013.04.030>

Schlegelmilch, K., Mohseni, M., Kirak, O., Pruszek, J., Rodriguez, J. R., Zhou, D., Kreger, B. T., Vasioukhin, V., Avruch, J., Brummelkamp, T. R., & Camargo, F. D. (2011). Yap1 Acts Downstream of  $\alpha$ -Catenin to Control Epidermal Proliferation. *Cell*, *144*(5), 782–795. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.031>

Schulte, J., Sepp, K. J., Jorquera, R. A., Wu, C., Song, Y., Hong, P., & Troy Littleton, J. (2010). DMob4/Phocein Regulates Synapse Formation, Axonal Transport, and Microtubule Organization. *Journal of Neuroscience*, *30*(15), 5189–5203.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5823-09.2010>

Seo, G., Han, H., Vargas, R. E., Yang, B., Li, X., & Wang, W. (2020). MAP4K Interactome Reveals STRN4 as a Key STRIPAK Complex Component in Hippo Pathway Regulation. *Cell Reports*, *32*(1), 107860.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.107860/ATTACHMENT/D3B77FCF-B1AC-4C9B-846B-75FB4F3E28A8/MMC6.XLSX>

Sertori, R., Trengove, M., Basheer, F., Ward, A. C., & Liongue, C. (2016). Genome editing in zebrafish: a practical overview. *Briefings in Functional Genomics*, *15*(4), 322–330. <https://doi.org/10.1093/BFGP/ELV051>

Seth, A., Stemple, D. L., & Barroso, I. (2013). The emerging use of zebrafish to model metabolic disease. *Disease Models & Mechanisms*, *6*(5), 1080.  
<https://doi.org/10.1242/DMM.011346>

- Shi, Z., Jiao, S., & Zhou, Z. (2016). STRIPAK complexes in cell signaling and cancer. *Oncogene*, 35(35), 4549–4557. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.9>
- Smith, J. R., Maguire, S., Davis, L. A., Alexander, M., Yang, F., Chandran, S., French-Constant, C., & Pedersen, R. A. (2008). Robust, persistent transgene expression in human embryonic stem cells is achieved with AAVS1-targeted integration. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(2), 496–504. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2007-0039>
- Sun, S., & Irvine, K. D. (2016). Cellular Organization and Cytoskeletal Regulation of the Hippo Signaling Network. *Trends in Cell Biology*, 26(9), 694–704. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.003>
- Taha, Z., Janse van Rensburg, H. J., & Yang, X. (2018). The Hippo Pathway: Immunity and Cancer. *Cancers 2018, Vol. 10, Page 94*, 10(4), 94. <https://doi.org/10.3390/CANCERS10040094>
- Trammell, M. A., Mahoney, N. M., Agard, D. A., & Vale, R. D. (2008). Mob4 plays a role in spindle focusing in *Drosophila* S2 cells. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 8), 1284–1292. <https://doi.org/10.1242/jcs.017210>
- van den Heuvel, S. (2005). Cell-cycle regulation. In *WormBook: the online review of C. elegans biology*. <https://doi.org/10.1895/WORMBOOK.1.28.1>
- Van houcke, J., De Groef, L., Dekeyster, E., & Moons, L. (2015). The zebrafish as a gerontology model in nervous system aging, disease, and repair. *Ageing Research Reviews*, 24(Pt B), 358–368. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2015.10.004>
- Varshney, G. K., Carrington, B., Pei, W., Bishop, K., Chen, Z., Fan, C., Xu, L., Jones, M., LaFave, M. C., Ledin, J., Sood, R., & Burgess, S. M. (2016). A High-Throughput functional genomics workflow based on CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in zebrafish. *Nature Protocols*, 11(12), 2357. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2016.141>
- Veraitch, F. S., & Al-Rubeai, M. (2005). Enhanced growth in NS0 cells expressing aminoglycoside phosphotransferase is associated with changes in metabolism, productivity, and apoptosis. *Biotechnology and Bioengineering*, 92(5), 589–599. <https://doi.org/10.1002/BIT.20632>

- Verduzco, D., & Amatruda, J. F. (2011). Analysis of Cell Proliferation, Senescence and Cell Death in Zebrafish Embryos. *Methods in Cell Biology*, *101*, 19–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387036-0.00002-5>
- Veres, A., Gosis, B. S., Ding, Q., Collins, R., Ragavendran, A., Brand, H., Erdin, S., Talkowski, M. E., & Musunuru, K. (2014). Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell*, *15*(1), 27. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2014.04.020>
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, *10*(8), 789–799. <https://doi.org/10.1038/NM1087>
- Wada, K. I., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., & Sasaki, H. (2011). Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development*, *138*(18), 3907–3914. <https://doi.org/10.1242/DEV.070987>
- Wang, T., Birsoy, K., Hughes, N. W., Krupczak, K. M., Post, Y., Wei, J. J., Lander, E. S., & Sabatini, D. M. (2015). Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science*, *350*(6264), 1096–1101. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAC7041/SUPPL\\_FILE/WANG-SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAC7041/SUPPL_FILE/WANG-SM.PDF)
- Wang, W., Huang, J., & Chen, J. (2011). Angiomotin-like proteins associate with and negatively regulate YAP1. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(6), 4364–4370. <https://doi.org/10.1074/JBC.C110.205401/ATTACHMENT/D6A5CABD-1C74-43DA-980A-D029AF9F05A1/MMC1.PDF>
- What conditions need to be met in order for a cell to pass the critical checkpoint the G1 stage? | Socratic.* (n.d.). Retrieved May 19, 2022, from <https://socratic.org/questions/what-conditions-need-to-be-met-in-order-for-a-cell-to-pass-the-critical-checkpoi>
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology* *2004 22:11*, *22*(11), 1393–1398. <https://doi.org/10.1038/nbt1026>
- Xie, R., Wen, F., & Qin, Y. (2020). The Dysregulation and Prognostic Analysis of STRIPAK Complex Across Cancers. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 625. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.00625/BIBTEX>

- Yadav, R. B., Burgos, P., Parker, A. W., Iadevaia, V., Proud, C. G., Allen, R. A., O'Connell, J. P., Jeshtadi, A., Stubbs, C. D., & Botchway, S. W. (2013). mTOR direct interactions with Rheb-GTPase and raptor: Sub-cellular localization using fluorescence lifetime imaging. *BMC Cell Biology*, *14*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-3/TABLES/3>
- Yin, F., Yu, J., Zheng, Y., Chen, Q., Zhang, N., & Pan, D. (2013). Spatial Organization of Hippo Signaling at the Plasma Membrane Mediated by the Tumor Suppressor Merlin/NF2. *Cell*, *154*(6), 1342–1355. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.08.025>
- Yu, F.-X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J. L., Lian, I., Wang, L. H., Zhao, J., Yuan, H., Tumaneng, K., Li, H., Fu, X.-D., Mills, G. B., & Guan, K.-L. (2012). Regulation of the Hippo-YAP Pathway by G-Protein-Coupled Receptor Signaling. *Cell*, *150*(4), 780–791. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.06.037>
- Yu, F. X., Meng, Z., Plouffe, S. W., & Guan, K. L. (2015). Hippo Pathway Regulation of Gastrointestinal Tissues. *Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev-Physiol-021014-071733*, *77*, 201–227. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-021014-071733>
- Yu, F. X., Zhao, B., & Guan, K. L. (2015). Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell*, *163*(4), 811–828. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.044>
- Yu, J., Zheng, Y., Dong, J., Klusza, S., Deng, W. M., & Pan, D. (2010). Kibra Functions as a Tumor Suppressor Protein that Regulates Hippo Signaling in Conjunction with Merlin and Expanded. *Developmental Cell*, *18*(2), 288–299. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2009.12.012/ATTACHMENT/E894C4A0-DA32-4719-8C7C-E51C1ABAF5/MMC1.PDF>
- Zhao, B., Li, L., Wang, L., Wang, C. Y., Yu, J., & Guan, K. L. (2012). Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes & Development*, *26*(1), 54–68. <https://doi.org/10.1101/GAD.173435.111>
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z.-C., & Guan, K.-L. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell

contact inhibition and tissue growth control. *Genes & Development*, 21(21), 2747–2761. <https://doi.org/10.1101/GAD.1602907>

Zheng, F., Liviu, M., Jun, H., Wei, W., Hao, L., Jan M, van D., Donald J, T., & Junjie, C. (2008). Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression. *Nature Cell Biology*, 10(9), 1076–1082. <https://doi.org/10.1038/NCB1767>

Zheng, Y., Wang, W., Liu, B., Deng, H., Uster, E., & Pan, D. (2015). Identification of Happyhour/MAP4K as Alternative Hpo/Mst-like Kinases in the Hippo Kinase Cascade. *Developmental Cell*, 34(6), 642–655. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2015.08.014/ATTACHMENT/0A61A52C-0C07-4A76-8D78-860C765A7034/MMC1.PDF>

