

Andreia Colaço

Caracterização da proteína Mob4 humana

Um estudo da execução da mitose



Universidade do Algarve

Mestrado em Oncobiologia-Mecanismos Moleculares do Cancro

2021

Andreia Colaço

Caracterização da proteína Mob4 humana

Um estudo da execução da mitose

Mestrado em Oncobiologia, 2º ano

Dissertação realizado com o objetivo da obtenção do título de mestre em Oncobiologia-Mecanismos Moleculares do Cancro

Cell Cycle and Cancer Biology Group, CBMR, Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina, UAlg

Trabalho realizado sob a orientação de:

Orientador: Professor Álvaro Tavares

Co-orientadora: Inês Baião, PhD



Universidade do Algarve

Mestrado em Oncobiologia-Mecanismos Moleculares do Cancro

2021

Universidade do Algarve
Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina
2020/2021

Título: Caracterização da proteína Mob4 humana, um estudo da execução da mitose

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

Eu, Andreia Isabel Gonçalves Colaço, declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados encontram-se devidamente citados no texto e contam da listagem de referências incluída.

(Assinatura da Autora)

Faro, 28 de maio de 2021

Universidade do Algarve
Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina
2020/2021

INDICAÇÃO DOS DIREITOS DE CÓPIA OU *COPYRIGHT*

Copyright: © 2021 Andreia Isabel Gonçalves Colaço

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.

Faro, 28 de maio de 2021

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais pelo apoio e suporte, que nunca escasseou, durante todo o meu percurso acadêmico e escolar. Sem o qual não me teria sido possível realizar e concluir os objetivos a que me propus, inclusivamente esta dissertação de mestrado e o projeto nela contemplado.

É também de agradecer ao Professor Álvaro Tavares, diretor do mestrado de Oncobiologia, por me receber no seu laboratório e orientar o meu trabalho, pela disponibilidade e aconselhamento concedidos que tanto auxiliaram na minha primeira experiência no mundo da investigação científica.

A todos os investigadores e colegas de laboratório, com especial agradecimento à Inês Baião, PhD e ao Juan Garrido-Maraver, PhD, pela gentileza e acessibilidade que permitiu um ambiente de trabalho agradável e saudável.

À Universidade do Algarve por permitir a minha formação no mestrado de Oncobiologia e providenciar o espaço laboratorial, o material e reagentes para a realização deste projeto.

Por último, agradecer os leitores desta dissertação, com a esperança de que o trabalho realizado e aqui descrito possa contribuir e inspirar muitos outros estudos sobre a temática em questão, nomeadamente as proteínas Mob e a mitose.

ÍNDICE DE MATÉRIAS

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO	i
INDICAÇÃO DOS DIREITOS DE CÓPIA OU <i>COPYRIGHT</i>	ii
AGRADECIMENTOS	iii
ÍNDICE DE MATÉRIAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
1.RESUMO	1
2.ABSTRACT	2
3.INTRODUÇÃO.....	3
3.1 A célula e a divisão celular	3
3.1.1 A divisão celular e as suas fases	3
3.1.2 Os checkpoints do ciclo de divisão celular	8
3.1.3 A célula e o cancro	10
3.2 As proteínas Mob na literatura	12
3.2.1 hMob1 A/B	14
3.2.2 hMob2	14
3.2.3 hMob3 A/B/C	15
3.3 A proteína Mob4 humana	16
3.4 O complexo STRIPAK	19
3.5 A via Hippo	23
3.5.1 Regulação da via Hippo pelo STRIPAK	27
3.6 Resultados anteriores que motivam este estudo	28
4.OBJETIVOS	32
5.ESTRATÉGIAS EXPLORADAS	33
5.1 O sistema AID	33

5.2 O sistema CRISPR/Cas9	34
5.3 A proteína foto-conversível Dendra	36
5.4 Transfecção estável	37
6.MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
6.1 Cultura de células	39
6.2 Curvas de morte.....	39
6.3 Amplificação, extração e purificação de plasmídeos	40
6.4 Digestão enzimática e eletroforese em gel de agarose	41
6.5 Construção da população celular hTERT RPE-1 Mob4-Dendra2	41
6.6 Construção da linha celular clonal HeLa Mob4-mAID-mCherry-NeoR	41
6.7 Extração de DNA genómico	42
6.8 Rastreamento de clones por PCR e eletroforese em gel de agarose.....	43
6.9 Preparação de lisados proteicos.....	44
6.10 SDS-PAGE e Western Blotting.....	44
6.11 Fixação de células e montagem de slides	46
6.12 Microscopia	46
6.13 Imunofluorescência.....	46
6.14 Tratamento com <i>Brefeldin A</i>	48
6.15 iRNA (RNA <i>interference</i>)	48
6.16 Sincronização com DTB (<i>double thymidine block</i>) e bloqueio em mitose	49
7.RESULTADOS	50
7.1 Determinação da concentração de G-418, Higromicina B e Puromicina que provoca morte celular total no período de uma semana	50
7.2 Confirmação da amplificação do plasmídeo pAL135.....	51
7.3 Rastreamento dos clones HeLa Mob4-mAID-mCherry-NeoR por PCR.....	52
7.4 Confirmação da expressão das proteínas Mob4-mAID-mCherry, em HeLa, e Mob4-Dendra2, em hTERT RPE-1, por Western Blot	55

7.5 A proteína Mob4 forma agregados citoplasmáticos em células interfásicas em HeLa e em RPE-1.....	57
7.6 A proteína Mob4 co-localiza com o Golgi em células HeLa, mas não em RPE-1	63
7.7 A <i>Brefeldin A</i> causa dispersão de Mob4, em células HeLa	65
7.8 A proteína Mob4 associa-se a filamentos do citoesqueleto em células RPE-1, mas não em HeLa.....	69
7.9 A proteína Mob4 está localizada nos polos do fuso mitótico durante a mitose	70
7.10 Depleção de Mob4 causa defeitos no alinhamento dos cromossomas e na formação do fuso mitótico	73
7.11 A proteína Mob4 tem uma expressão regulada ao longo do ciclo celular? .	76
8.DISSCUSSÃO.....	79
9.CONCLUSÃO.....	87
10.PERSPECTIVAS FUTURAS	89
11.BIBLIOGRAFIA.....	91
11.1 Referências bibliográficas	91
11.2 Referência da Web.....	100
12.ANEXOS.....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 -Ilustração simplificada representativa do ciclo de divisão celular (interfase e mitose)	4
Figura 2 -Ilustrações simplificadas representativas da expressão das ciclinas nas respetivas fases do ciclo de divisão celular (interfase e mitose)	5
Figura 3 -Ilustração representativa das fases da mitose e citocinese numa célula animal	7
Figura 4 -Esquema ilustrativo dos três checkpoints que controlam o ciclo celular	10
Figura 5 -Modelo proposto por Hanahan e Weinberg, em 2011, das dez hallmarks do cancro.....	12
Figura 6 -Esquema representativo das diversas vias e processos celulares em o envolvimento das Mob é conhecido	16
Figura 7 -Componentes principais do complexo STRIPAK em células de mamíferos .	21
Figura 8 -Simplificação ilustrativa da via de sinalização das MAPK.....	22
Figura 9 -Comparação das vias Hippo (em <i>Drosophila melanogaster</i>) e MST1/2 (em mamíferos).....	24
Figura 10 -A via Hippo e a sua regulação	26
Figura 11 -Regulação da via Hippo pelo STRIPAK	28
Figura 12 -Localização de Mob4 em células HeLa, em interfase (em cima) e em mitose (em baixo).....	29
Figura 13 -Principais defeitos mitóticos causados pela depleção de Mob4 em células HeLa	31
Figura 14 -Construção de mutantes AID e degradação proteica pelo sistema, em células humanas	34
Figura 15 -Representação do funcionamento do sistema CRISPR/Cas9	35
Figura 16 -Espetros de excitação e de emissão das formas nativa e ativada da proteína Dendra2	36
Figura 17 -Ilustração esquemática da criação de uma linha celular que expressa uma proteína de interesse, através de uma transfecção estável	37

Figura 18 -Curvas de morte para a G-418, em células HeLa	47
Figura 19 -Resultado da digestão enzimática do plasmídeo pAL135, utilizando as enzimas de restrição EcoR V e Not I.....	48
Figura 20 -Estratégia utilizada para o rastreo dos clones HeLa Mob4-mAID-mCherry-NeoR.....	50
Figura 21 -Rastreo dos clones 54-78, a título de exemplo, utilizando apenas o par de primers A.....	51
Figura 22 -As células CRAL 30 são monoalélicas para a inserção do sistema AID.....	52
Figura 23 -As células CRAL 30 expressam a proteína Mob4-mAID-mCherry.....	53
Figura 24 - A proteína Mob4-Dendra2 é expressa na população de células RPE-1 criada	54
Figura 25 -As células CRAL 30 apresentam marcação para a Mob4	55
Figura 26 -As células RPE-1 Mob4-Dendra2 apresentam marcação específica para a proteína Mob4	57
Figura 27 -O padrão de localização de Mob4 nas células interfásicas CRAL 30 e nas células interfásicas RPE-1 não é semelhante.....	59
Figura 28 -A Mob4 co-localiza com o Golgi em células HeLa, em interfase, mas não nas RPE-1	61
Figura 29 -A Mob4 não co-localiza com o Golgi durante mitose, em células HeLa	62
Figura 30 -A Brefeldin A causa dispersão da Mob4, em células HeLa	65
Figura 31 -A Mob4 associa-se a filamentos do citoesqueleto e acumula-se nos pontos de aderência celular, em células RPE-1	66
Figura 32 -A Mob4 acumula-se nos pontos de aderência celular, em células HeLa.....	67
Figura 33 -A Mob4 está localizada nos polos do fuso mitótico em células metafásicas.	69
Figura 34 -A Depleção de Mob4 causa defeitos mitóticos em células RPE-1	71
Figura 35 -Análise de mRNA de Mob4 por Western Blot.....	73
Figura 36 -Análise do padrão de expressão de Mob4 ao longo do ciclo celular.....	74

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 -Homologia entre as sequências das proteínas hMob1A e as restantes hMob	13
Tabela 2 -Homologia entre as sequências das proteínas hMob e dMob	13
Tabela 3 -Descrição dos primers utilizados para rastreamento dos clones Mob4-mAID-mCherry-NeoR, em células HeLa	44
Tabela 4 -Anticorpos primários e secundários utilizados nas imunofluorescências	47
Tabela 5 -Diferenças e semelhanças no comportamento da proteína Mob4 observadas entre as linhas celulares HeLa e hTERT RPE-1	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A

AID system – do inglês, Auxin Inducible Degron system

APC – do inglês, Anaphase-Promoting Complex

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

Arp 2/3 – do inglês, Actin-Related Proteins 1 and 2

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

HDR – do inglês, Homology Directed Repair

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, respetivamente

N

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

Nf2 – do inglês, Neuromatosis 2

NHEJ – do inglês, Non-Homologous End Joining

P

PAM – do inglês, Prospacer 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, Spinde 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.RESUMO

A divisão celular é um processo essencial à manutenção da vida e à reprodução dos organismos, sendo, por consequência, um processo altamente regulado. No laboratório Cell Cycle and Cancer Biology Group pretende-se compreender este processo, recorrendo-se à *Drosophila melanogaster* e a células humanas como modelos.

A proteína Mob4 é altamente conservada na natureza, constituindo uma das principais proteínas que formam o complexo STRIPAK, no entanto escasso é o conhecimento acerca das suas funções biológicas. Resultados anteriores do laboratório apontam para um papel essencial da proteína Mob4 na regulação e execução da mitose, nomeadamente na formação do fuso mitótico e no correto alinhamentos dos cromossomas mitóticos.

Com este estudo, pretende-se elucidar qual a função biológica e molecular da Mob4, incluindo no processo de divisão celular, recorrendo, para tal, à criação de linhas celulares Mob4 nulas, em células humanas tumorais (HeLa) e não tumorais (hTERT RPE-1). Estas linhas permitem, simultaneamente, a avaliação da localização subcelular da Mob4 e o seu possível papel noutros processos celulares.

Os resultados obtidos neste estudo seguem que a proteína Mob4 se pode associar ao organelo membranar Golgi, atuando na sua manutenção estrutural e no transporte vesicular. A Mob4 interage também com filamentos do citoesqueleto, ao que tudo indica filamentos de actina, podendo desta forma contribuir para a regulação do citoesqueleto celular, nomeadamente a nível estrutural e na mobilidade celular. Por fim, em mitose, os resultados apresentados neste estudo confirmam os resultados previamente obtidos no laboratório, indicando que a Mob4 poderá estar associada aos centrossomas e aos cinetocoros, contribuindo para a estabilidade da ligação microtúbulos-cinetocoros e sendo necessária para a progressão da mitose.

Concluindo, a Mob4 é uma proteína que aparenta estar envolvida em diversos processos biológicos essenciais, nomeadamente, na mitose, podendo ser uma das proteínas que regula este processo.

Palavras-chave: mitose, proteína Mob4, complexo STRIPAK, via Hippo, Golgi, iRNA

2.ABSTRACT

Cell division is an essential process for the maintenance of life and the reproduction of organisms, being, therefore, a highly regulated process. In the Cell Cycle and Cancer Biology Group, we intend to understand this process, using *Drosophila melanogaster* and human cells as models.

Mob4 protein is a highly conserved protein in nature, constituting one of the main proteins forming the STRIPAK complex, however there is little knowledge about its biological functions. Previous results from the laboratory point to an essential role of the Mob4 protein in the regulation and execution of mitosis, namely in the formation of the mitotic spindle and in the correct alignment of mitotic chromosomes.

With this study, we intend to elucidate the biological and molecular function of Mob4, including in the cell division process, using, for this purpose, Mob4 null cell lines, in human tumor cells (HeLa) and human non-tumor cells (hTERT RPE-1). These cell lines allow, simultaneously, the evaluation of the subcellular localization of Mob4 and its possible role in other cellular processes.

The results obtained in this study show that Mob4 protein can associate with the Golgi apparatus, acting in its structural maintenance and in vesicular transport. Mob4 also interacts with cytoskeleton filaments, apparently actin filaments, and can thus contribute to the regulation of cell cytoskeleton, namely at the structural level and in cell mobility. Finally, in mitosis, the results presented in this study confirm the results previously obtained in the laboratory, indicating that Mob4 may be associated with centrosomes and kinetochores, contributing to the stability of the microtubule-kinetochore attachment and that it may be necessary for the progression of mitosis.

In conclusion, Mob4 is a protein that appears to be involved in several essential biological processes, including mitosis, and may be one of the proteins that regulate this process.

Keywords: mitosis, Mob4 protein, STRIPAK complex, Hippo pathway, Golgi apparatus, RNA interference

3.INTRODUÇÃO

3.1 A célula e a divisão celular

A célula é a unidade básica de todos os seres vivos, executando todos os processos biológicos e bioquímicos necessários para o desenvolvimento e manutenção da vida em todos os organismos. Facto que só é possível devido à capacidade de multiplicação e renovação atribuída à grande maioria das células que compõem um organismo vivo. A este processo chama-se divisão celular, sendo um evento irreversível, unidirecional e altamente regulado e controlado, no qual uma célula-mãe se divide, originando duas células-filhas idênticas a si e entre si.¹ Para completar uma divisão celular as células passam por três fases principais, a interfase, a mitose e a citocinese.

3.1.1 A divisão celular e as suas fases

Durante a interfase, ocorrem maioritariamente processos de crescimento celular e de duplicação de organelos e do DNA, que serão posteriormente segregados para cada uma das células-filha.

A interfase é então sub-dividida em três fases: fase G1 (gap 1), fase S (síntese) e fase G2 (gap 2) (figura 1). Na fase G1 ocorre um elevado crescimento celular devido à intensa atividade bioquímica e potencial osmótico necessários para a duplicação dos organelos, bem como de todas as estruturas requeridas para a formação de novas células, verificando-se assim um considerável aumento no volume celular durante este período.^{1,2} É então nesta fase que a célula prepara os blocos de construção e armazena a energia necessários para a replicação de DNA, que ocorrerá na fase seguinte. Assim, na fase S dá-se a síntese de novo DNA (replicação do DNA), que resulta na formação dos cromatídios-irmãos, que se encontram ligados através da sua região centromérica. É também nesta fase que se observa a duplicação dos centríolos, que vão dar origem ao fuso mitótico, responsável pelo movimento dinâmico e pela separação dos cromossomas durante a mitose. Por fim, na fase G2, a célula novamente armazena energia e os blocos de construção necessários para a mitose, o citoesqueleto é desmantelado e, quando todos os recursos estão reunidos, a célula pode entrar em mitose.^{1,2,3}

De destacar, que é na fase G1 que ocorrem os principais eventos regulatórios que levam à proliferação celular. A transição da fase G1 para a fase S é mediada por fatores de crescimento, no entanto existe um momento em que ocorre o comprometimento da célula, em que esta se compromete a avançar no ciclo celular, sendo este um ponto sem retorno. Assim, a célula não precisa, a partir deste ponto, de fatores de crescimento para avançar e completar a divisão celular. Este momento ocorre em G1 e foi denominado de ponto de restrição (R) (figura 1). Uma vez que a célula passa o ponto de restrição, está então comprometida a realizar síntese de DNA, não necessitando de fatores de crescimento extracelulares durante o restante do ciclo celular.^{1,3}

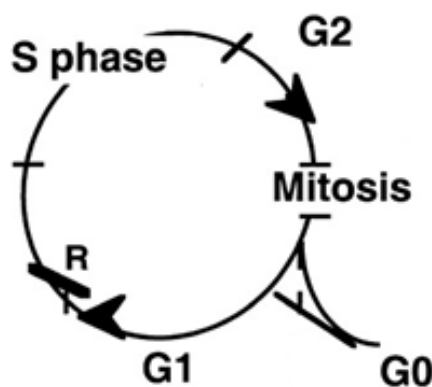


Figura 1-Ilustração simplificada representativa do ciclo de divisão celular (interfase e mitose). A interfase composta pelas fases G1, S e G2, sendo neste período que a célula prepara as reservas de energia e toda a maquinaria necessárias para a repartição equitativa do material celular pelas duas células-filhas, já em mitose. Está também representado, durante a fase G1, o ponto de restrição (R), que se entende pelo ponto, sem retorno, em que a célula se compromete a completar a divisão celular, deixando de precisar de fatores de crescimento para tal. Terminada a mitose, a célula é deixada com a decisão de recomençar um novo ciclo de divisão celular ou entrar na fase de quiescência (G0 ou gap 0), onde as células não apresentam resposta, até certo grau, aos fatores de crescimento, mantendo-se assim no seu estado mais diferenciado e sem se dividirem. Legenda: G0- gap 0 ou estado de quiescência; G1- gap 1 ou fase de crescimento; R- ponto de restrição; S phase- fase de síntese; G2- gap 2. Imagem adaptada de ³ *Blagosklonny, M. V., & Pardee, A. B. (2002)*.

O ciclo de divisão celular é, na verdade, regulado pelos complexos ciclina/cdk's (quinases dependentes de ciclinas).^{1,5} As ciclinas, tal como o nome indica, são proteínas que apresentam uma expressão cíclica aos longo do ciclo de divisão celular.¹ Esta ciclicidade deve-se à sua degradação altamente regulada, assim uma célula em divisão entra e sai de uma determinada fase do ciclo dependendo da ciclina que está a ser sintetizada ou degradada naquele dado momento. Ou seja, para que a célula possa entrar numa

determinada fase do ciclo a ciclina correspondente à fase anterior terá de ser degradada, enquanto que a ciclina correspondente à fase seguinte terá de ser sintetizada. Esta dinâmica de síntese e degradação das ciclinas permite a associação de uma ciclina a cada fase do ciclo, permitindo assim o avançar, no tempo adequado, da divisão celular (figura 2).^{1,5}

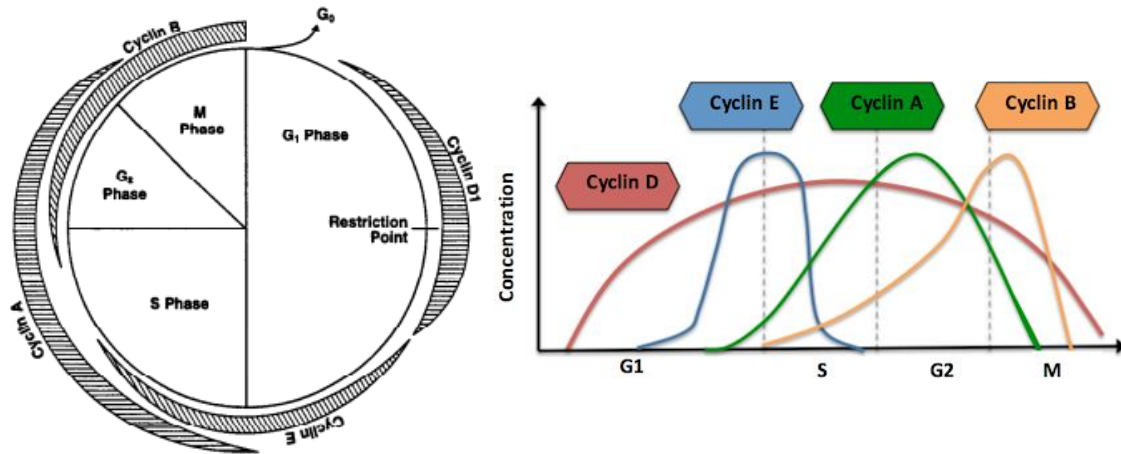


Figura 2-Ilustrações simplificadas representativas da expressão das ciclinas nas respetivas fases do ciclo de divisão celular (interfase e mitose). A síntese da ciclina D1 (complexo ciclina/cdk4/6) inicia a entrada da célula na divisão celular, na fase G₁, aquando a degradação da ciclina D1 e a síntese de ciclina E (complexo ciclina E/cdk 2) dá-se a entrada na fase S. Já a progressão pela fase S é marcada pela degradação da ciclina E e pela síntese da ciclina A (complexo ciclina A/cdk 2), a formação do novo complexo da ciclina A com a cdk 1 permite a progressão do ciclo para a fase G₂, e por fim é a degradação da ciclina A e a síntese da ciclina B (complexo ciclina B/cdk 1) que permite o término da interfase e a entrada em mitose. Durante a mitose ocorre a degradação abrupta da ciclina B, o que permite à célula sair de mitose. Legenda: G₀- gap 0 ou estado de quiescência; G₁- gap 1 ou fase de crescimento; S phase- fase de síntese; G₂- gap 2; M phase- mitose. Imagem adaptada de ¹ *Schafer, K. A. (1998)* (esquerda) e de ¹<http://www.cubocube.com/> (direita), consultado em junho 2021.

Terminada a interfase, a célula pode avançar para a mitose (ou fase M). Na mitose ocorre a divisão nuclear, onde os cromossomas são alinhados, separados e segregados para as duas células-filhas. A fase mitótica compreende cinco sub-fases: prófase, prometáfase, metafase, anáfase e telófase (figura 3). Na primeira fase da mitose, a prófase, os cromossomas iniciam a sua condensação, num processo que se estenderá até à metafase, onde estes atingem o seu estado de condensação máxima.⁴ É nesta fase que a coesina (proteína que mantém os cromatídios-irmãos ligados) é degradada ao longo dos braços dos cromatídios, permitindo o início da sua separação sendo, no entanto, mantida a ligação destes na região centromérica. Durante a prófase, o fuso mitótico começa a

formar-se devido à migração dos dois centrossomas para os polos opostos deste, enquanto que os microtúbulos começam a polimerizar a partir destes (figura 3). A fragmentação do envelope nuclear marca a entrada em prometáfase, sendo que este é um passo essencial para completar a formação do fuso mitótico, só assim sendo permitido o acesso dos microtúbulos aos cromossomas. Nesta fase existe uma grande dinâmica no que diz respeito aos microtúbulos, estes polimerizam e despolimerizam enquanto crescem e se estendem a partir dos centrossomas para o centro da célula, procurando fixar-se nos cinetocoros de cada cromossoma. À medida que a prometáfase avança os microtúbulos ligam-se aos cinetocoros de cada cromossoma, puxando cada um dos cromatídios-irmãos em direções opostas, exercendo uma tensão na direção dos dois polos opostos do fuso; isto sem separar os cromatídios que continuam firmemente ligados ao seu par com coesina na região centromérica (figura 3). É já na metafase que, no seu estado mais compactado, os cromossomas se alinham no plano equatorial do fuso mitótico (figura 3). Apenas quando os cromossomas estiverem corretamente alinhados, o fuso corretamente montado e a ligação microtúbulos-cinetocoros corretamente estabelecida, a célula pode avançar para a anáfase, onde ocorrerá a segregação dos cromatídios-irmãos. Na anáfase, por fim, ocorre a degradação da coesina na região centromérica dos cromossomas, permitindo assim a separação dos cromatídios--irmãos, que são puxados pelos microtúbulos em direção aos polos opostos do fuso (figura 3). Acredita-se que este processo é possível devido a três movimentos distintos que ocorrem durante a anáfase, sendo o primeiro a despolimerização dos microtúbulos na sua extremidade ligada aos cinetocoros, o que permite a migração dos cromossomas para os polos do fuso mitótico (movimento pelo qual os microtúbulos puxam os cromossomas), durante a **anáfase a**. O segundo movimento é o movimento de deslizamento dos microtúbulos interpolares (não ligados aos cinetocoros), que se movem uns sobre os outros, através do auxílio das proteínas motoras cinesinas, movimento este que empurra os polos do fuso em direções opostas. O terceiro e último movimento é o movimento dos microtúbulos astrais que se estendem dos centrossomas e se ligam à membrana citoplasmática, que despolimerizam e encurtam, puxando os polos do fuso para ainda mais perto das extremidades celulares, afastando-os. Os dois últimos movimentos referidos constituem a **anáfase b** e permitem o distanciamento máximo dos dois centrossomas e dos dois polos, alongando o fuso mitótico e permitindo a separação máxima do conteúdo celular para a sua separação e distribuição correta pelas células-filhas. A última fase da mitose é a telófase, em que os cromossomas alcançam os polos do fuso e começam a descondensar, de forma semelhante

o fuso mitótico é desfeito e os microtúbulos despolimerizam. É também nesta fase que dois envelopes nucleares se formam, encapsulando os dois conjuntos de cromossomas no interior da célula (figura 3).

A telofase é seguida da citocinese, a última fase da divisão celular, em que o objetivo é a divisão do citoplasma pelas duas células-filhas. Nesta fase ocorre a distribuição dos restantes componentes celulares pelas duas recém-formadas células e a sua separação física (figura 3). Para tal, um anel contrátil composto por filamentos de actina é formado na placa metafásica aquando a anafase. Mais tarde, já durante a citocinese, estes filamentos de actina puxam o equador da célula, formando uma fissura (o sulco de clivagem). O sulco acentua-se conforme o anel de actina se contrai e, eventualmente, a membrana é clivada em dois, originando duas células-filhas completamente separadas.⁴

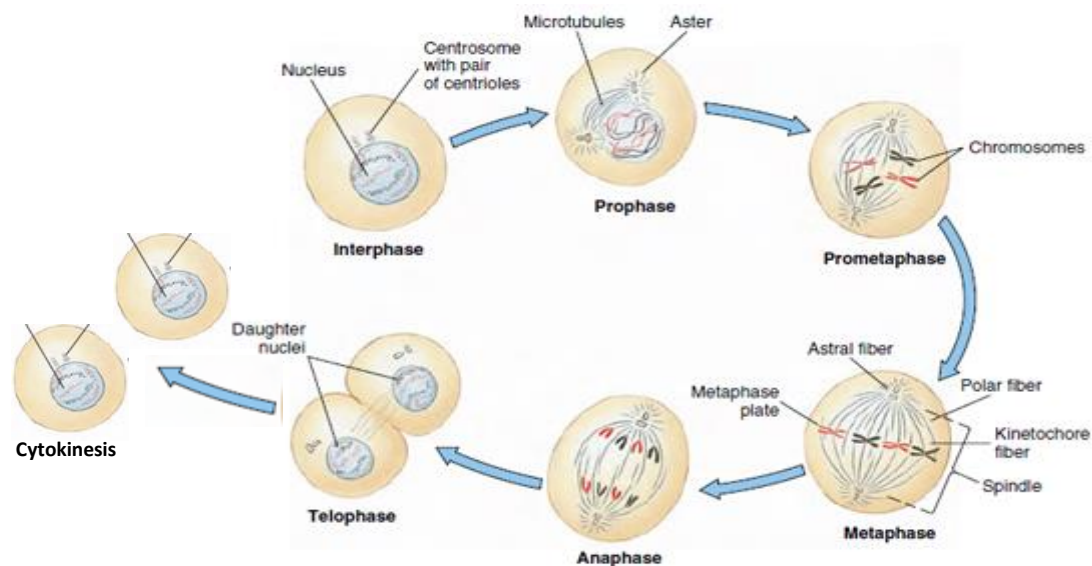


Figura 3-Ilustração representativa das fases da mitose e citocinese numa célula animal. A mitose é constituída por cinco fases: prófase, prometáfase, metafase, anafase e telofase. Em prófase dá-se a condensação dos cromossomas e o início da migração dos dois centrossomas para os polos do fuso. Em prometáfase 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 telofase, 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 anel de contração contráctil de actina que cliva a membrana citoplasmática e permite a abscisão das células. Imagem adaptada de ²<https://biocyclopedia.com/>, consultado em junho de 2021.

Após completar o ciclo de divisão celular, a célula pode recomeçar este ciclo e realizar uma nova divisão ou, por outro lado, ir para a fase G0 (gap 0 ou fase de quiescência) (figura 1). Nesta fase, a célula tem tolerância aos fatores de crescimento e permanece sem mostrar resposta a estes devido ao seu comprometimento com o seu estado de diferenciação, não se dividindo. No entanto, estas células retêm a capacidade de realizar a divisão e mantêm o seu potencial para entrar de novo no ciclo celular.¹

3.1.2 Os checkpoints do ciclo de divisão celular

Como já mencionado anteriormente, o processo de divisão celular é altamente controlado, pelo que danos no DNA, falhas na sua replicação ou o incorreto alinhamento dos cromossomas em metafase podem levar à paragem do ciclo celular, morte celular (apoptose) ou a células mutadas.^{1,3,6,7} De modo a evitar a formação e perpetuação de progenia aberrante e garantir uma transmissão exata e precisa da informação genética, a célula utiliza vários mecanismos, entre os quais: mecanismos de reparação de DNA, mecanismos de paragem do ciclo celular e mecanismos de indução de morte celular aquando a não reparação dos erros detetados. Aos mecanismos de deteção destes erros (erros no DNA e montagem do fuso mitótico) denomina-se de *checkpoints* do ciclo celular. São conhecidos três *checkpoints*, os quais descreverei abaixo: o *checkpoint* em G1, o *checkpoint* em G2 e o *checkpoint* do fuso mitótico (figura 4).^{1,6}

O *checkpoint* em G1 monitoriza danos no DNA e a sua reparação, antes da replicação (figura 4).^{1,6} Nesta fase, danos encontrados no DNA conduzem à paragem do ciclo celular, constituindo um atraso neste, de modo a conceder tempo à célula para ativar os mecanismos de reparação de DNA e, assim, corrigir os erros e prosseguir com a divisão celular. Esta paragem celular, em específico, é dependente da p53 (proteína supressora de tumores, também conhecida como a “guardiã do genoma”), que responde à presença de danos no DNA, permitindo apenas a continuação do ciclo celular depois da reparação destes. No caso de danos demasiados extensos ou em que o DNA não possa ser reparado, a célula sai do ciclo celular e é, preferencialmente, induzida à apoptose, pois não é possível para a célula entrar em fase S e replicar o DNA aquando a presença de danos neste.^{1,6} Deste modo, a célula consegue evitar a replicação de DNA aberrante.³ O segundo *checkpoint* ocorre em G2 e, de forma semelhante ao primeiro checkpoint, também monitoriza o DNA.^{1,6} Quer danos no material genético, quer DNA não replicado são

detetados por este *checkpoint* e ambos conduzem a paragem do ciclo celular, sendo que a célula não entrará em mitose na presença de danos no DNA ou erros de replicação (figura 4). Neste caso, ao contrário de em G1, a paragem do ciclo celular não é dependente da p53, visto que células nulas para esta proteína, apesar de não conseguem realizar a paragem em G1, como esperado, ainda retêm a capacidade de parar o ciclo celular em G2. Estas observações mostram que a p53 não é necessária para a ativação deste *checkpoint*, que depende então de outros mecanismos.^{1,3} É desta maneira que a segregação, em mitose, de cromossomas defeituosos é prevenida pela célula. Por último, o terceiro **checkpoint** ocorre em mitose, e tem o nome de *checkpoint* do fuso mitótico ou SAC (*spindle assembly checkpoint*) e assegura a correta segregação dos cromatídios-irmãos para cada uma das células-filha, em anafase (figura 4).^{6,7} Para que tal aconteça é necessária a correta ligação entre os cinetocoros dos cromatídios-irmãos aos microtúbulos de lados opostos do fuso mitótico. Uma vez que essa ligação ocorre, tensão é exercida nos cinetocoros dos cromatídios e é sentida por proteínas quinases aí presentes, tais como a proteína Aurora B.⁷ Assim que todos os cinetocoros estão corretamente ligados aos microtúbulos e alinhados na placa metafásica, o *checkpoint* é desativado e o Complexo Promotor da Anafase (APC) é ativado, promovendo a degradação da ciclina mitótica (ciclina B) e da coesina (que até então mantinha os cromatídios-irmãos ligados através da região centromérica). Estão reunidas, agora, as condições para que a célula avance para a anafase e para que ocorra a segregação equitativa dos cromossomas, prevenindo-se, deste modo, aneuploidias aquando a formação das células-filhas.⁷

Depois de clarificado o funcionamento e objetivos destes *checkpoints* do ciclo celular, fica bastante evidente que estes visam, principalmente, assegurar a integridade e a exata quantidade de genoma na próxima geração de células.⁷ No entanto, e como é normal na natureza, os *checkpoints* podem falhar, permitindo assim que células com defeitos sejam originadas da divisão celular. Daqui poderão resultar células com mutações no DNA ou células aneuploides, que poderão continuar a dividir-se, podendo dar origem a várias patologias, entre as quais cancros.^{1,3,6,8}

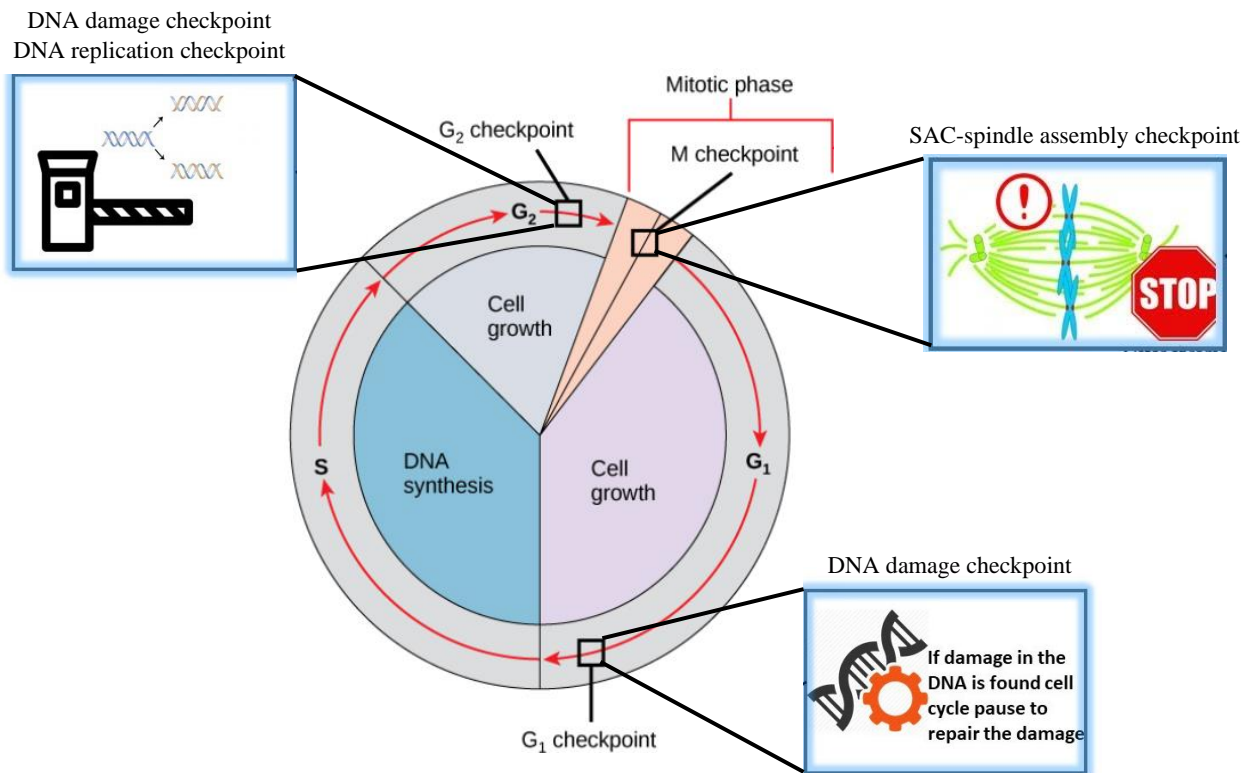


Figura 4-Esquema ilustrativo dos três *checkpoints* que controlam o ciclo celular. Nas fases G₁ e G₂, os checkpoints visam assegurar a integridade do DNA que vai ser replicado e segregado para as células-filha. Em caso de erros no DNA, estes *checkpoints* são ativados e levam à paragem do ciclo celular até à reparação desses danos, caso a reparação não seja possível, a célula não conseguirá prosseguir com a divisão celular e ficará senescente ou realizará a apoptose. Em mitose, o SAC deteta a não ligação ou a ligação incorreta de cinetocoros-microtúbulos, impedindo a entrada da célula em anafase. Quando os cromossomas se encontram corretamente ligados aos microtúbulos e alinhados na placa metafásica equatorial, o SAC é desativado e o complexo APC promove a entrada da célula em anafase. A falha destes *checkpoints* poderá dar origem a células-filha portadoras de mutações ou aberrantes. Imagem adaptada de ³<https://courses.lumenlearning.com/>, consultado em junho de 2021.

3.1.3 A célula e o cancro

Tumores são descritos como um crescimento anormal de tecido provocado pela rápida e descontrolada proliferação celular, sendo seguro assumir que esta é originada pela desregulação do ciclo celular.^{1,9} É também sabido que o cancro é uma doença genética, maioritariamente desencadeada por alterações em duas categorias de genes, os genes supressores de tumores e os oncogenes, que quando mutados, através de perda ou ganho de função, respetivamente, vão conferir à célula um aumento na capacidade proliferativa. No entanto, o processo tumorigénico é um processo *multistep*, em que cada passo reflete

alterações genéticas, envolvendo diversas vias celulares, desde vias de proliferação a vias metabólicas, conferindo assim à célula vantagem proliferativa, num estágio inicial, e capacidade de invasão, num estágio mais avançado.^{9,10}

Há cerca de duas décadas, **Douglas Hanahan e Robert A. Weinberg** propuseram seis *hallmarks* requeridas para uma célula se tornar uma célula tumoral, sendo que em 2011, estes autores introduziram ao seu modelo inicial quatro novas *hallmarks*, numa publicação ao qual chamaram *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. O modelo corrente atualmente, que descreve as alterações que uma célula tumoral sofre de modo a adquirir a malignidade típica de células presentes na grande maioria dos cancros pode ser visto na **figura 5**. Neste, é possível perceber a complexidade de processos e vias biológicas que estão ligadas à transformação tumoral, englobando processos tão diversos como proliferação e morte celular, processos de inflamação e processos do metabolismo energético, entre outros.

Entre as várias vias biológicas envolvidas neste processo de tumorigénese, é de mencionar a via Hippo, esta está envolvida no desenvolvimento de tecidos, atuando como uma via de sinalização reguladora do crescimento, proliferação e diferenciação celulares. A via Hippo é descrita como uma via supressora de tumores, devido ao seu papel na supressão de genes envolvidos no crescimento, proliferação e migração celular.^{11,12} A inibição desta via é, portanto, observadas em diversos cancros. Sendo ela mesma regulada a vários níveis por diversas proteínas, esta via apresenta-se como sendo um elemento relevante para este estudo, pelo que será discutida em mais detalhe nos capítulos vindouros deste trabalho.

Já revistos os elementos e etapas básicas da divisão celular e o seu envolvimento no desenvolvimento neoplásico, é chegado o momento de introduzir os objetos centrais de estudo neste trabalho, sendo estes as proteínas Mob.



Figura 5-Modelo proposto por Hanahan e Weinberg, em 2011, das dez *hallmarks* do cancro. É possível observar a complexidade na formação e organização dos tecidos neoplásicos, sendo que cada uma das *hallmarks* descritas, (1) a sustentação de sinais proliferativos, (2) a evasão a supressores de crescimento, (3) a supressão de respostas imunes, (4) a aquisição de imortalidade replicativa, (5) a promoção da inflamação associada a tumorigênese, (6) a ativação da capacidade invasiva e de metástase, (7) a indução da angiogênese, (8) a instabilidade genómica e elevada taxa mutacional, (9) a resistência à apoptose e (10) a desregulação do metabolismo energético, está associada à desregulação de uma via celular. Em conjunto, estas transformações possibilitam a sobrevivência, crescimento e metastização do tecido neoplásico. Imagem adaptada de ¹⁰Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011).

3.2 As proteínas Mob na literatura

A família de proteínas Mob (monopolar spindle-one-binder proteins) é constituída por sete proteínas, em humanos, altamente conservadas na natureza. As Mob são proteínas globulares com cerca de 110 a 140 aminoácidos (aproximadamente, 26 kDa, em humanos, ⁴UniProt), de ancoragem (*scaffold*), não sendo conhecida nenhuma atividade enzimática por parte destas.¹³

Foram, pela primeira vez, descritas em levedura, onde as duas proteínas Mob existentes neste organismo, Mob1p e Mob2p estão envolvidas no controlo da saída da mitose e na

regulação da morfogênese, respetivamente. Ambas as proteínas mostraram associar-se, em complexos, com proteínas da família de quinases NDR/LATS, regulando, desta maneira, diversos processos celulares.^{13,14}

Em *Drosophila melanogaster* estão descritas quatro proteínas Mob. dMob1 (ou Mats, *Mob as tumor supressor*), está envolvida na regulação da proliferação celular e morte celular, sendo uma das principais proteínas envolvidas na via Hippo, interagindo a diferentes níveis, com diversas proteínas nesta via.¹³ Em suma, dMob1 atua como um co-ativador desta via, que como mencionado anteriormente, é um essencial regulador da morfogênese. Assim, foi observado que moscas nulas para a proteína Mats não são viáveis, sendo a depleção desta proteína letal para estes indivíduos. dMob2, dMob3, e dMob4 são as restantes três proteínas Mob presentes em *Drosophila melanogaster*, no entanto não se encontram tão extensamente caracterizadas quanto dMob1. Estas proteínas aparentam desempenhar algum papel no desenvolvimento morfogénico, nomeadamente, na regulação do desenvolvimento neuronal, apesar do mecanismo pelo qual isto acontece permanecer por elucidar.^{13,15}

Em humanos são então conhecidas sete proteínas Mob: hMob1A, hMob1B, hMob2, hMob3A, hMob3B, hMob3C e hMob4 (ou phocein). Estas proteínas apresentam grande homologia quer entre si, quer com os seus homólogos em *Drosophila melanogaster*, tal como mostram as tabelas seguintes, tabelas 1 e 2, respetivamente:

Tabela 1-Homologia entre as sequências das proteínas hMob1A e as restantes hMob

Gene	hMob1B	hMob2	hMob3A	hMob3B	hMob3C	hMob4
Homologia	96%	37%	51%	51%	48%	22%

Tabela 2-Homologia entre as sequências das proteínas hMob e dMob

Genes	hMob1A	hMob2	hMob3A	hMob4
dMob1	85%	36%	47%	20%
dMob2	30%	42%	28%	17%
dMob3	51%	27%	64%	20%
dMob4	21%	17%	20%	80%

3.2.1 hMob1 A/B

As proteínas Mob1A e Mob1B são, na sua maioria, proteínas citoplasmáticas, com uma função redundante, devida à sua grande homologia (ver tabela 1). As Mob1 têm a capacidade de ativar as quinases NDR/LATS, aquando a sua ligação à membrana citoplasmática. 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 (figura 6).¹³ Foi também demonstrada a presença desta proteína nos cinetocoros e nos centrossomas durante a prometáfase, estando esta envolvida na duplicação destes últimos.¹⁶ Depleção de Mob1 em células humanas demonstrou uma prolongada separação dos centríolos após mitose, bem como a incapacidade das células de completarem a abscisão, falhando a citocinese.^{17,18} Facto que se deve a uma hiper-estabilização dos microtúbulos na região do *mid-body*, impedindo assim a separação das duas células-filha. Mais interessante, apesar de permanecerem ligadas, as células-filhas demonstram um aumento na mobilidade celular, aquando a depleção de Mob1. Já uma sobre-expressão desta proteína impede a separação dos centrossomas, sugerindo que a Mob1 poderá estar envolvida na regulação centrossomal durante a mitose, na regulação da estabilidade dos microtúbulos e ser necessária para a realização da citocinese.¹⁷

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.¹³

3.2.2 hMob2

A proteína Mob2, em células humanas, é ambas citoplasmática e nuclear.¹³ Ao contrário do que acontece com a Mob1, a Mob2 apenas forma complexos com as proteínas quinases NDR 1/2, não sendo conhecida qualquer associação direta desta proteína com as quinases LATS ou com as proteínas MST 1/2. Mob2 e Mob1 ligam-se ao mesmo domínio proteico das NDR 1/2, pelo que competem pela ligação a estas proteínas. Apesar desta semelhança, o efeito exercido por estas duas Mob é oposto, sendo que Mob1 promove a atividade das NDR, enquanto que a Mob2 a inibe.¹³ Foi também demonstrada a interação de Mob2 com

a proteína RAD50 (figura 6), um dos principais componentes do complexo de deteção de danos no DNA.^{13,19} Revelando, assim, o possível papel da Mob2 na sinalização de danos no DNA durante o ciclo celular. De facto, foi verificado que a depleção de Mob2 em células humanas desencadeia a paragem do ciclo celular nas fases G1/S, sendo esta paragem despoletada de uma forma dependente à p53.^{13,19}

Apesar de se começarem a conhecer os efeitos e defeitos no ciclo celular causados pela depleção de Mob2, ainda não se sabe se a desregulação desta proteína detém algum efeito direto no desenvolvimento de neoplasias, isto devido, maioritariamente, à escassez de modelos animais com perda de função da proteína Mob2.¹³

3.2.3 hMob3 A/B/C

As proteínas Mob3 são, de forma semelhante às Mob1, maioritariamente citoplasmáticas. Poucos são os parceiros conhecidos das Mob3, de facto até hoje apenas a interação com a proteína MST1 foi demonstrada.¹³ Através desta interação, a Mob3 regula a sinalização apoptótica (figura 6), sendo que sobre-expressão desta proteína inibe a apoptose em células humanas.²⁰ No entanto, estudos de interação sugerem que a Mob3 poderá estabelecer ligação com outras proteínas.¹³ Até à data não é conhecido nenhum envolvimento da Mob3 em mitose.

O papel das Mob3 em tumores ainda permanece também por clarificar, sendo que, com base em diversos estudos, esta parece atuar como um supressor de tumores em certos tipos de cancros (como em cancro da próstata) e como um oncogene noutros (Mob3 está sobre-expresso em paciente com glioblastoma multiforme²⁰, conduzindo, nestes casos, a uma diminuição da capacidade apoptótica celular nos tecidos neoplásicos, como descrito acima).¹³

Por fim, a proteína Mob4, também conhecida como *phocain*, é a última proteína da família das Mob humanas a ser aqui mencionada e é também o foco principal deste estudo. Apesar de pouco caracterizada, até ao momento, e sendo apenas, quase exclusivamente, conhecida como um dos principais integrantes do complexo STRIPAK^{13, 21-27} (figura 6), a Mob4 será discutida no subcapítulo seguinte, subcapítulo **3.3**.

De um modo geral, muito falta ainda conhecer das proteínas Mob, tendo-se apenas começado a desvendar as vias e as interações destas proteínas, que parecem estar envolvidas em diversos processos celulares. A **figura 6** é bastante elucidativa no que respeita ao conhecimento, de forma sucinta, adquirido sobre esta família de proteínas e também no que respeita às questões que estão ainda por responder.

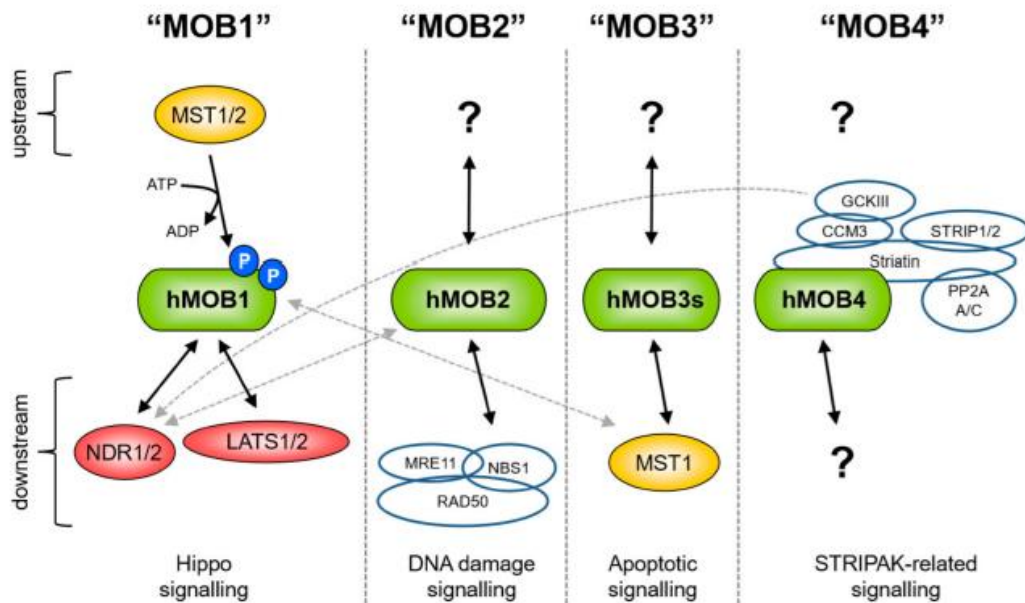


Figura 6-Esquema representativo das diversas vias e processos celulares em o envolvimento das Mob é conhecido. A Mob1 humano é fosforilada por MST1/2, promovendo a ativação das quinases NDR1/2 e LATS1/2, na sinalização da via Hippo. A Mob2 interage com a RAD50, no complexo que funciona como um sensor para a deteção de danos no DNA, agindo no contexto da sinalização dos defeitos no DNA, durante o ciclo celular. A Mob3 atua na regulação da apoptose, ao interagir com a MST1. E finalmente a Mob4 faz parte do complexo STRIPAK, estando envolvida nas funções biológicas das quais este participa. É ainda possível observar neste esquema que as vias nas quais as Mob estão envolvidas não são vias isoladas, mas que estão interligadas. Por exemplo, de notar a interligação das vias Mob1 e Mob2 através da competição pela ligação às quinases NDR1/2. Interações bem estabelecidas estão representadas por linhas pretas, enquanto que interações presumíveis estão representadas com linhas a tracejado cinza. Fosforilações estão indicadas com “P” a azul. Imagem retirada de ¹³ **Gundogdu, & Hergovich. (2019).**

3.3 A proteína Mob4 humana

Como mencionado acima, não foram conduzidos muitos estudos no sentido de elucidar as funções biológicas e celulares da proteína Mob4, especialmente da Mob4 humana.

Em *Drosophila melanogaster*, a dMob4 é uma proteína reguladora da neurogênese, nomeadamente na regulação das ramificações neurais durante o desenvolvimento larvar, na regulação do transporte axonal e na formação de sinapses em moscas adultas²⁸, por fim foi observado que dMob4 está envolvida na organização dos microtúbulos durante a mitose.²⁹ É especulado que as funcionalidades observadas de dMob4 estejam relacionadas ao facto desta proteína poder pertencer ao complexo STRIPAK, em *Drosophila melanogaster*.¹³ A depleção desta proteína é letal para os estados larvares deste organismo,²⁸ no entanto este fenótipo pode ser recuperado pela introdução da Mob4 humana, revelando assim uma elevada conservação funcional desta proteína entre as duas espécies.

Em humanos é, de facto, conhecida a ligação da hMob4 ao STRIPAK, sendo esta um dos principais componentes deste complexo.^{13, 21-27} 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.^{22, 24, 26, 27} 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 específica da Mob4 neste mecanismo ou em qualquer outro processo associado ao complexo STRIPAK não está ainda clara.

A Mob4 interage também com a MST4^{13, 30}, proteína pertencente à família das proteínas MST1/2 e um dos componentes do complexo STRIPAK²⁴, interação esta que ocorre de uma forma dependente de fosforilação³⁰. **Chen e colegas (2018)** propuseram 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.³⁰ No entanto, e mais uma vez, estas interações não estão ainda devidamente estudadas ou elucidadas.

Baillat e colegas (2001) mostram 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.³¹ 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)³¹, suportando assim um importante papel da Mob4 no transporte de vesículas membranares.^{24, 31, 32}

Células humanas que sofreram depleção de Mob4 expressam fenótipos aberrantes durante mitose, nomeadamente defeitos no fuso mitótico¹³, 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 querem sugerir 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 a 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.

Estudos em linhas celulares tumorais humanas revelaram também que a depleção de Mob4 reduz, significativamente, a sobrevivência das células, em diversos tipos de tumores.^{13, 33} Estas observações estão em concordância com a sobre-expressão de Mob4 observada em diversos tumores, nos mais variados tecidos, desde o pâncreas¹³ à mama, sendo esta proteína já utilizada como um marcador de mau prognóstico em cancros renais e do fígado (⁵The Human Protein Atlas).

Como se pode concluir, 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 clarificadas. Sendo, um dos objetivos deste estudo, a confirmação e elucidação do envolvimento da Mob4 em alguns dos processos mencionados acima.

3.4 O 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*).²¹ Este complexo demonstra uma grande conservação evolucionária e está envolvido na regulação de uma elevada variedade de processos biológicos.^{21-27, 34-38} Para além da Mob4 e da *striatin*, o STRIPAK é composto pelas proteínas PP2A, CCM3, proteínas das família GCKIII e pela STRIP1/2, tal como é possível observar na **figura 7**.^{13, 21, 22, 24}

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.²¹⁻²³

PP2A (serine/threonine protein phosphatase 2) é uma proteína heterotrimérica composta por uma subunidade catalítica (PP2Ac), uma subunidade de ancoragem (PP2Aa) e uma subunidade regulatória²¹. 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.^{21,35}

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).^{13, 22, 35} 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.²²

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).²² A principal função das CCM3 no complexo STRIPAK é recrutar as proteínas GCKIII e estabelecer a sua ligação à *striatin* (figura 7). 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.^{22,38}

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.^{22,39} 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).³⁹

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- ϵ), respetivamente, sendo estes dois complexos mutualmente exclusivos.^{13, 25} A **figura 7** ilustra os dois complexos STRIPAK alternativos com o seu núcleo comum e as proteínas alternativas adicionais, que foram acima descritas.

Tendo revisto e sumariado o complexo STRIPAK de uma perspetiva estrutural, passemos agora 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.²⁴ Ou seja, dependendo das subunidades de *striatin* e STRIP, o STRIPAK pode ou não estar localizado no envelope nuclear e no Golgi, enquanto que 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 centróssomas, 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.^{24, 40}

O STRIPAK tem sido associado com as mais diversas vias de sinalização e processos biológicos nas células, desde a proliferação celular à apoptose^{21, 22, 24, 25, 35}, à polaridade e migração celular^{22, 24, 38}, à regulação da montagem e fragmentação do Golgi²¹, regulação do transporte vesicular e regulação do citoesqueleto^{21, 24, 34}, à angiogénese²¹,

neurogênese^{21, 24}, e até à regulação da concentração de cálcio na células²¹, entre outros processos celulares.

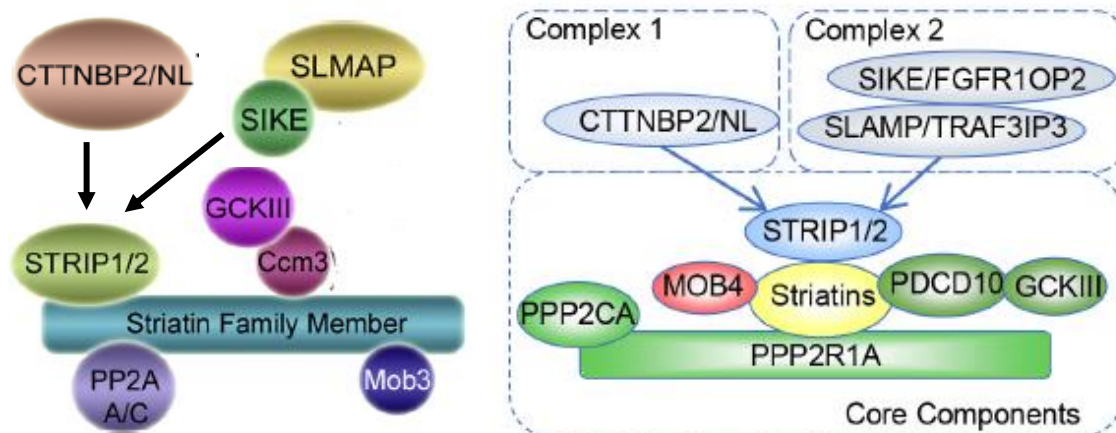


Figura 7-Componentes principais do complexo STRIPAK em células de mamíferos. Na figura são mostrados dois esquemas distintos que ilustram a composição do STRIPAK e as interações proteicas neste. É possível ver a *striatin* como o componente central do complexo, que interage diretamente com as proteínas 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, respetivamente (como ilustrado à direita da figura). Imagem adaptada de ²¹ **Hwang and Pallas (2014)** (à esquerda) e retirada de ²⁵ **Xie et al (2020)** (à direita).

Uma das vias de sinalização mais relevante que é regulada pelo STRIPAK é a via das MAPK (figura 8), que está envolvida em diversos processos celulares e que responde, entre outros, a estímulos hormonais e a fatores de crescimento.²² 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.^{22, 24, 37} 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.²² 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).^{21, 25}

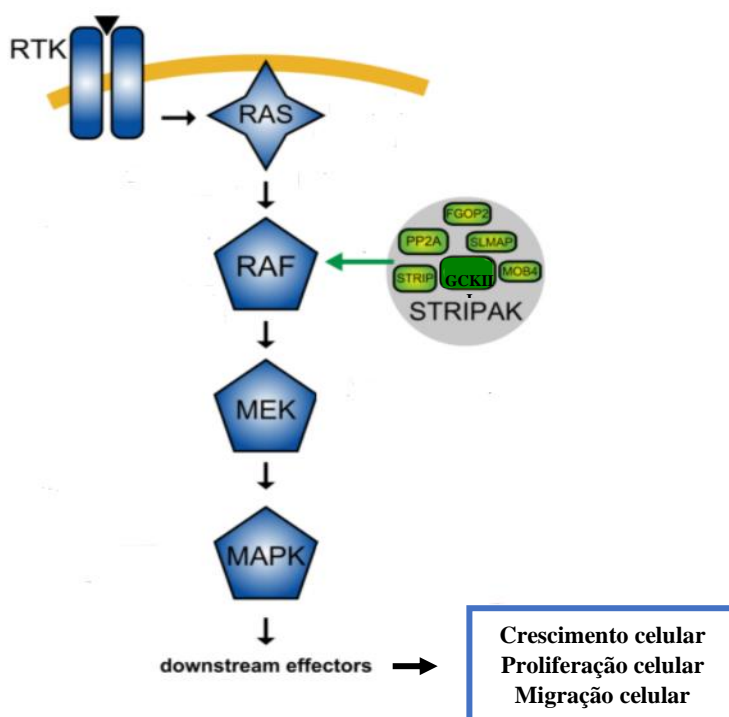


Figura 8- Simplificação ilustrativa da via de sinalização das MAPK. Esta via é constituída por diversas quinases: as MAPKKKs (representadas por Raf, na figura), as MAPKKs (representadas por MEK, na figura) e as MAPKs (ou ERK). Quando estimulada, esta via é ativa, o que resulta na fosforilação, em cascata, 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 de⁴¹ 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.^{22, 24} Foi observado que a depleção de STRN e CTTNBP2 em células humanas conduz à instabilidade e despolimerização de microtúbulos, inibindo assim a divisão celular²²; 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.^{22,24} 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.²² 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.^{22, 25}

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 **3.5.1**, depois de uma sucinta introdução à estrutura e função da Hippo, em humanos.

3.5 A via 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 componentes⁴²⁻⁴⁸ (figura 9). 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.⁴²⁻⁴⁸

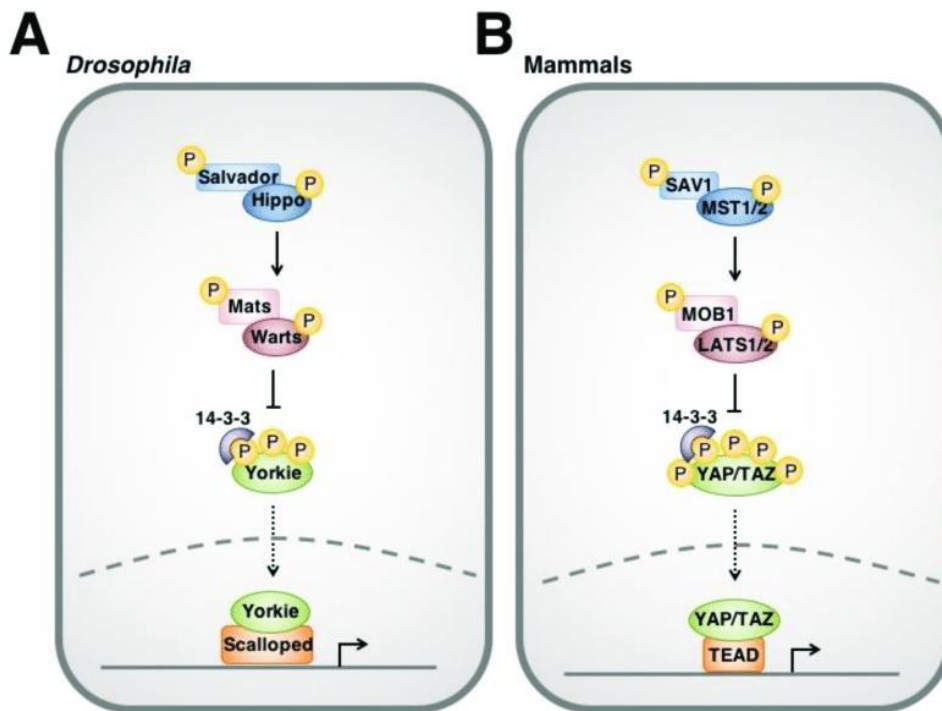


Figura 9- Comparação das vias Hippo (em *Drosophila melanogaster*) e MST1/2 (em mamíferos). Esta via de sinalização é altamente conservada entre moscas e mamíferos, sendo que todas as proteínas centrais na sua cascata de sinalização são ortólogas nestes organismos. A via Hippo é, em humanos, constituída pelas proteínas MST1/2 (homólogas 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 Scalped). Imagem retirada de ⁴⁸ 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 (previamente descrita no subcapítulo 3.2.1), respetivamente, tal como é mostrado na **figura 9**.^{42, 45, 46, 48} 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 9), 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.^{42,45,46}

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.^{49,50} 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.^{49,50} Amot interage também com a proteína YAP, sequestrando-a nas junções de oclusão ou nos filamentos de actina,^{51,52} como mostrado na **figura 10**.

Somando, à inibição direta pelas LATS1/2 e pelas Amot, YAP é também inibido pela α -catenina, que ao formar uma complexo com a 14-3-3, nas junções aderentes (figura 10), o inativa e impede a sua translocação pra o núcleo.⁵³ A via Hippo responde a sinais de tensão celular, contacto célula-célula e contacto célula-substrato^{54,55}, 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 mecanotransdução⁵⁶.

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.⁵⁷ 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 10), dependendo do tipo de estímulo recebido nos recetores GPCR (*G protein-coupled receptors*).^{54,55,58-61}

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,⁶²⁻⁶⁴ tal como é exemplificado na **figura 10**. 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.⁶⁵

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.⁴²⁻⁶⁵

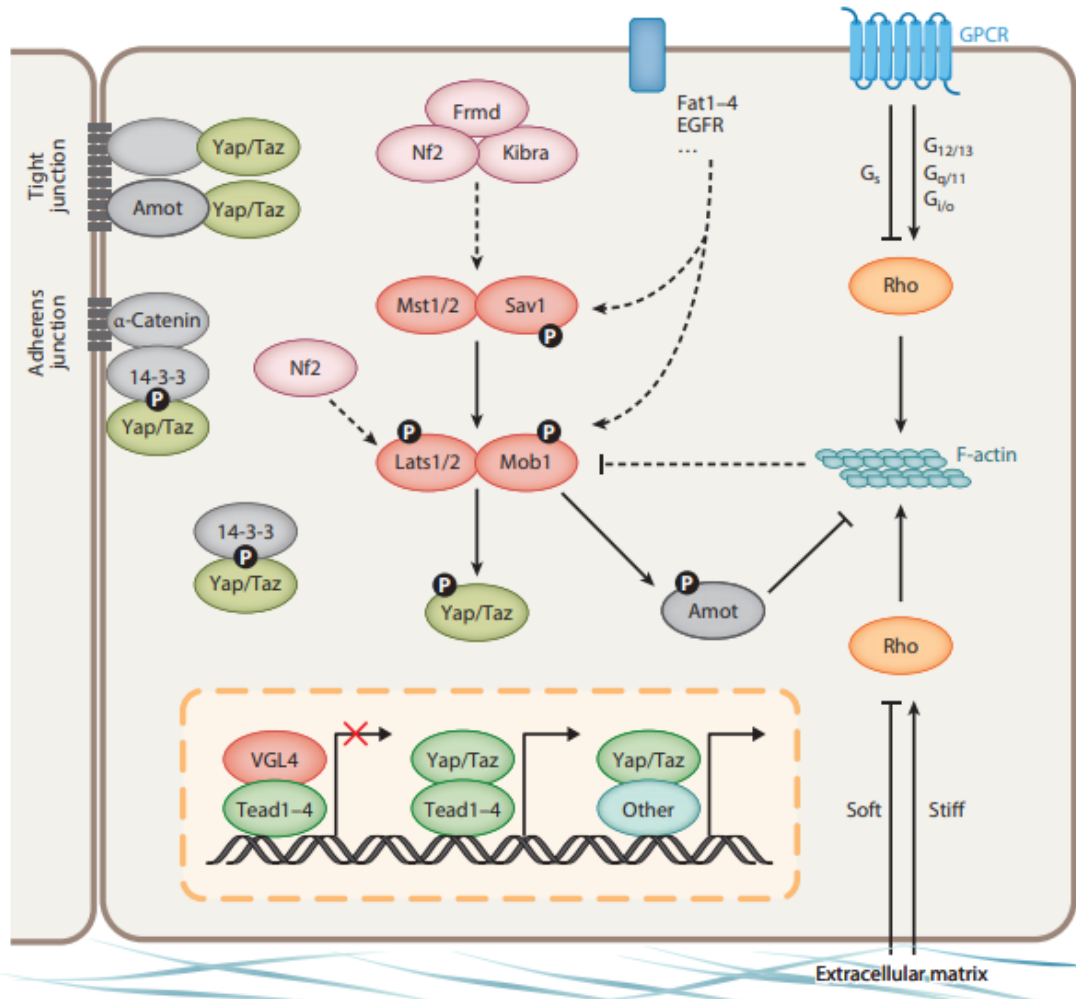


Figura 10-A via Hippo e a sua regulação. Quando não fosforilados o YAP e TAZ interagem com a família de proteínas TEAD e outros fatores de transcrição, no núcleo. No entanto, YAP/TAZ são regulados negativamente de diversas formas: pelos componentes centrais da via Hippo, as quinases MST1/2 e LATS1/2, que o fosforilam; pelas proteínas Amot, que o sequestram nas junções de oclusão; e pelo complexo α -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 de⁵⁷ 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.

3.5.1 Regulação da via Hippo pelo 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.^{22, 26, 37} 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 9), nomeadamente proliferação, diferenciação e migração celular. De forma a contrariar este mecanismo, a proteína SAV1, que está ligada à MST1/2 (figura 9), inibe a atividade do SLMAP, na tentativa de restaurar a atividade das quinases MST.^{26, 37} No entanto, a STK25, proteína da família das GCKIII e constituinte do STRIPAK (figura 7), tem a capacidade de, diretamente, fosforilar a SAV1, prevenindo que esta iniba a SLMAP e, conseqüentemente, o STRIPAK.²⁶ 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, 66, 67} 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.⁶⁶ Assim, quer as MST, quer as MAP4Ks, são suficientes, mas não necessárias, para iniciar a cascata de sinalização da via Hippo.⁶⁶ 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.^{27, 35} 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.²⁷

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.

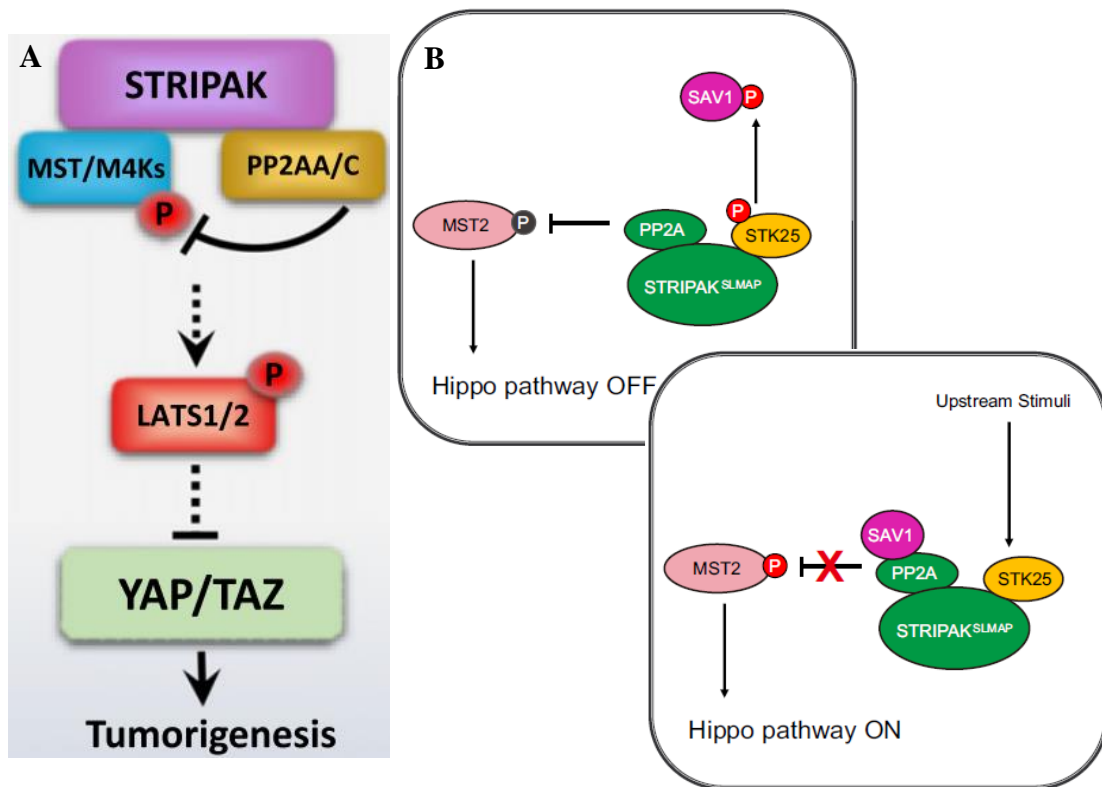


Figura 11-Regulação da via Hippo pelo STRIPAK. (A) Modelo simplificado que demonstra a inibição da via Hippo pelo STRIPAK. A PP2A inibe a fosforilação das quinases MST e das MAP4Ks, permitindo a ativação da YAP/TAZ, no núcleo, o que leva à promoção de processos biológicos potencialmente tumorigênicos. (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 a 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) ³⁷Ardestani and Maedler (2020) e (B) ²⁶Bae and Luo (2020).

3.6 Resultados anteriores que motivam este estudo

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 Golgi^{31, 68, 69} ou do retículo endoplasmático^{70, 71} ou, talvez, ambos, como é de observar na **figura 12**. Já em mitose, Mob4 parece estar localizada em dois pequenos agregados nos polos do fuso mitótico (figura 12) (Cláudia Florindo, 2007, dados não publicados), sendo esta marcação semelhante à dos centrossomas.⁷²⁻⁷⁴ 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.

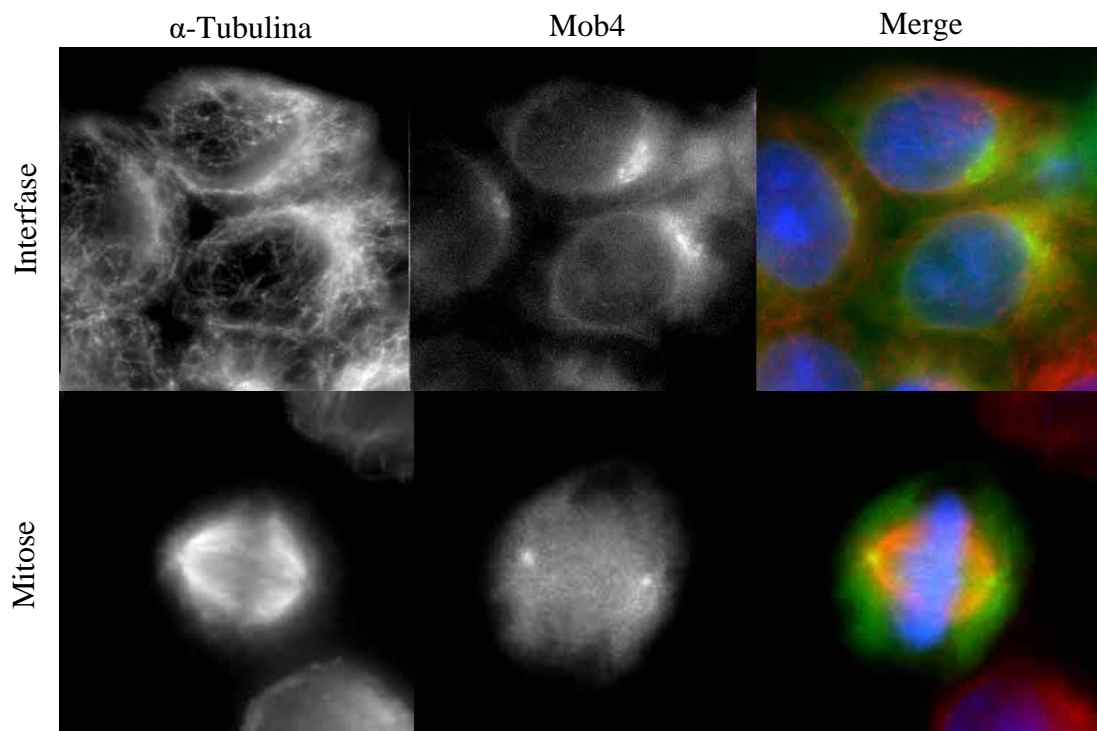


Figura 12-Localização de Mob4 em células HeLa, em interfase (em cima) e em mitose (em baixo). Em interfase, Mob4 apresenta-se localizada perinuclearmente, enquanto que em mitose aparenta estar localizada em dois agregados, nos polos do fuso. Azul-DNA, vermelho- α -tubulina, verde-Mob4. Cláudia Florindo, 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 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 a depleção de proteínas do cinetocoros^{75, 76}, 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.

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.

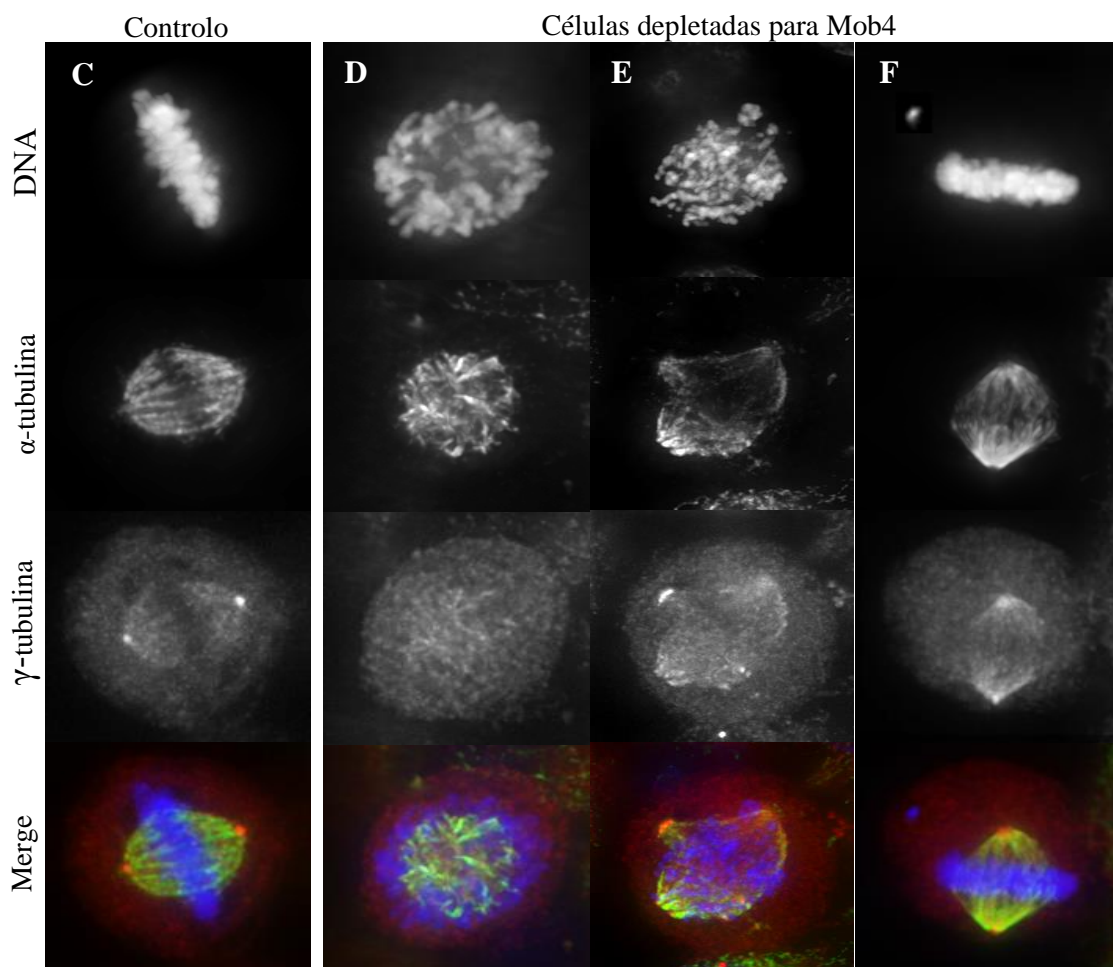
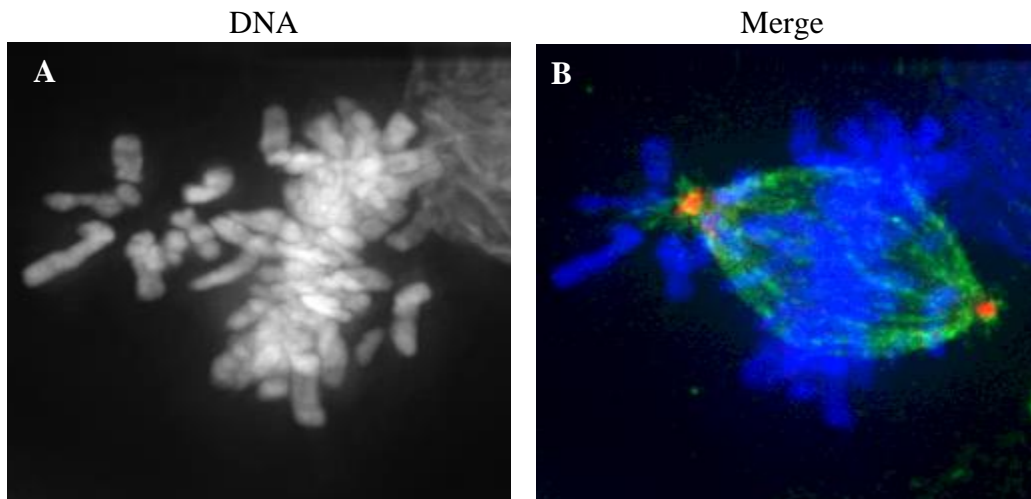


Figura 13-Principais defeitos mitóticos causados pela depleção de Mob4 em células HeLa. (A-B) Defeitos no alinhamento dos cromossomas mitóticos em metafase. (C-F) Defeitos mais frequentes no fuso mitótico em células depletadas de Mob4, tais como (D) colapso do fuso, (E) fuso malformado e (F) fuso não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

4.OBJETIVOS

Este estudo tem como principal objetivo elucidar as funções da proteína Mob4, nomeadamente durante a mitose. Para tal pretendeu-se descrever a localização subcelular desta proteína e caracterizar os defeitos observados aquando a depleção da Mob4, usando o sistema AID e iRNA, em células humanas, de modo a reunir pistas sobre as suas potenciais funções.

Recorreu-se, para este efeito, à criação de duas populações de células, em duas linhas celulares distintas, células HeLa e células hTERT RPE-1. Utilizando células HeLa pretendeu-se construir uma linha celular clonal que expresse o sistema AID, integrado a jusante do gene Mob4 e, nas células RPE-1, pretendeu-se a criação de uma população celular que expresse a proteína de fusão Mob4-Dendra2.

Estabelecidos os objetivos, (1) construção das duas linhas celulares e (2) caracterização da localização e das consequências da depleção de Mob4 nas duas populações de células acima citados, vou de seguida apresentar as estratégias aplicadas com o intuito de atingir os objetivos aqui explicitados.

5. ESTRATÉGIAS EXPLORADAS

5.1 O sistema AID

Tendo em vista a criação de uma linha celular, em células HeLa, que possibilitasse a visualização e degradação da Mob4 nas células foi utilizado o sistema AID.

O sistema AID (*auxin-inducible degron*) é um método que permite a rápida depleção de proteínas-alvo, aquando a introdução de auxina nas células (figura 14).⁷⁷⁻⁸⁰ Este sistema foi, pela primeira vez descrito em plantas, no entanto tem vindo a ser aplicado em células animais para estudos de função proteica (principalmente, no caso de proteínas essenciais).⁷⁸

Em plantas, este sistema constitui uma importante via no controlo do crescimento e desenvolvimento, sendo regulado pela auxina (família de hormonas presentes em diversas plantas).⁷⁷ Como é possível observar na **figura 14**, a auxina liga-se à proteína TIR1 (*transport inhibitor response 1*) e promove a interação do complexo proteico SCF-TIR1 com a proteína-alvo. Este complexo vai, posteriormente, recrutar a ubiquitina E2, que vai ubiquitinar a proteína-alvo, resultando na sua rápida degradação pelo proteassoma.⁷⁷⁻⁸⁰

Para a utilização deste sistema em células eucarióticas é necessária a introdução da sequência do *degron* (parte da sequência codificante da proteína responsiva à auxina) após a sequência que codifica a proteína-alvo (figura 14).⁷⁷⁻⁸⁰ Organismos eucariotas expressam formas homólogas das proteínas presentes no complexo SCF-TIR1, exceto da proteína TIR1. A proteína TIR1 necessita de ser introduzida em células eucariotas, incluindo as humanas, sendo comumente utilizada a proteína OsTIR1, encontrada na planta *Oryza sativa*. A sequência codificante para a OsTIR1 é, normalmente, colocada sob o promotor da tetraciclina, sendo necessário o tratamento das células com esta droga para ativar a expressão da proteína.⁷⁷⁻⁸⁰ Quer a integração do AID, quer a integração do OsTIR1 no genoma das células eucarióticas é realizada recorrendo ao sistema CRISPR/Cas9 (figura 14), o qual descreverei brevemente de seguida.^{78, 79} Da mesma forma, homólogos das auxinas são apenas encontrados em espécies de plantas.⁷⁷ A auxina é introduzida nas através da sua adição ao meio de cultura. Reunidas todas as condições necessárias, a depleção da proteína-alvo ocorre entre 10-20 minutos após o tratamento com auxina.⁷⁷⁻⁸⁰

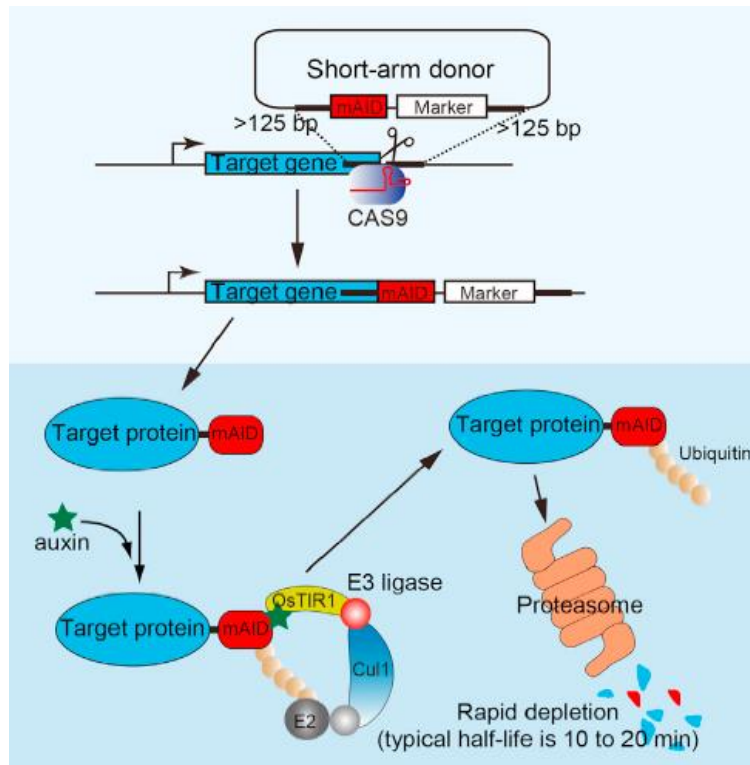


Figura 14-Construção de mutantes AID e degradação proteica pelo sistema, em células humanas. O AID é integrado no genoma, utilizando o sistema CRISPR/Cas9, o que possibilita a rápida degradação da proteína-alvo. O complexo SCF-TIR1 recruta a ubiquitina E2, aquando a presença de auxina, que marca a proteína para degradação no proteossoma. Imagem retirada de ⁷⁹ Natsume et al (2016).

Em adição ao AID, é integrado no genoma um repórter (como, a GFP ou RFP, que é também degradado pelo sistema)⁷⁷ e um gene de resistência a uma droga (como, gentamicina ou puromicina), tudo isto numa única construção.⁷⁷⁻⁸⁰ Estes componentes permitem a visualização da proteína nas células por microscopia de fluorescência e a seleção de células que integraram o AID, respetivamente.

5.2 O sistema CRISPR/Cas9

O CRISPR (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) é uma técnica de edição genómica,^{81, 82} sendo inicialmente descoberta como um mecanismo do sistema imunitário em bactérias.⁸³ Este sistema permite às bactérias defenderem-se contra plasmídeos e bacteriófagos, causando a disrupção do material genómico destes.⁸³

Nos últimos anos, tornou-se um método muito estudado e amplamente utilizado laboratorialmente e clinicamente, sendo aplicado na engenharia genética e na terapia génica, respetivamente.^{81, 82} Com o sistema CRISPR é possível ativar, desativar ou corrigir erros em genes-alvo no genoma de células ou indivíduos, sendo uma técnica relativamente acessível e simples. Pode ser utilizada tanto na construção de modelos celulares (como é o caso deste estudo), tanto na geração de modelos animais.⁸¹

Dois componentes essenciais compõem este sistema: um *guide-RNA* (sgRNA), que é uma pequena sequência de RNA, responsável por reconhecer o gene-alvo; e a Cas9 (*CRISPR-associated protein 9*), uma endonuclease que vai quebrar a dupla cadeia de DNA^{81, 82} (figura 15). O *guide-RNA* guia a Cas9 para o sítio do genoma que se pretende modificar, assim a Cas9 poderá cortar o DNA num alvo-específico. O corte na dupla cadeia de DNA, catalisado pela Cas9, vai ser reparado pelas células, sendo que estas podem fazê-lo de duas maneiras: junção de extremidades não homólogas (NHEJ) ou recombinação homóloga (HDR). Na ausência de uma sequência da cadeia-molde, a reparação NHEJ é ativada, o que resulta em erros na sequência de DNA que foi reparada, tais como inserções ou deleções que ocorrem de modo aleatório. Já na presença de uma cadeia-molde, a célula ativarará a reparação HDR, que permitirá a inserção de mutações pontuais específicas.⁸¹⁻⁸²

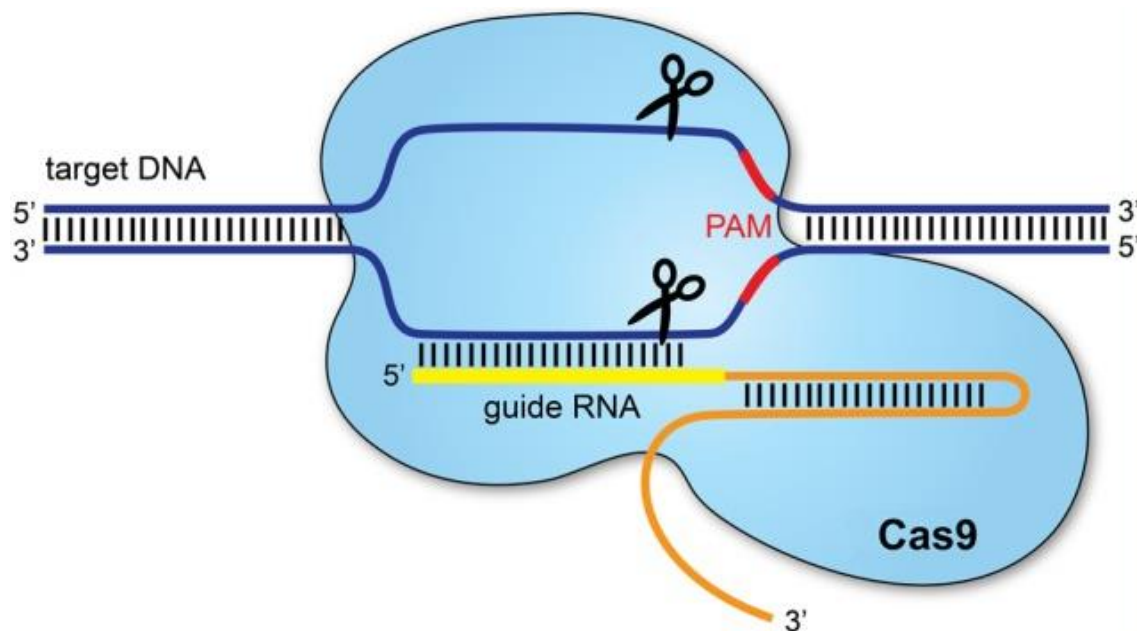


Figura 15-Representação do funcionamento do sistema CRISPR/Cas9. Após a identificação da sequência-alvo pelo sgRNA, a Cas9 corta a dupla cadeia de DNA, permitindo a inserção de erros no genoma. Nota: PAM (*protospacer adjacent motif*) é uma pequena sequência de DNA que deve estar presente na zona adjacente à sequência-alvo, de forma a permitir o corte pela Cas9; diferentes Cas9 requerem e reconhecem diferentes PAM. Imagem retirada de ⁸¹Redman et al (2016).

No caso particular deste estudo, o sistema CRISPR/Cas9 permitiu a inserção da construção, contendo o AID, o repórter e o gene de resistência a um antibiótico, depois do último exão do nosso gene-alvo, o Mob4.

5.3 A proteína foto-conversível Dendra

Quanto às células hTERT RPE-1, foi criada uma população de células em a Mob4 é expressa em fusão com a proteína Dendra2.

A Dendra pertence à família de proteínas fluorescentes foto-ativáveis, sendo uma proteína foto-conversível de verde-para-vermelho.⁸⁴⁻⁸⁶ Esta pode ser observada no verde (aproximadamente, nos 510 nm) quando não está foto-ativada (estado nativo) e no vermelho (aproximadamente, nos 570 nm) depois de foto-ativada (estado ativado), como demonstrado na **figura 16**. Esta proteína é foto-ativada através da utilização de luz Ultravioleta (aproximadamente, entre os 350 nm e os 410 nm), onde ocorre a sua mais eficaz conversão de verde para vermelho⁸⁵.

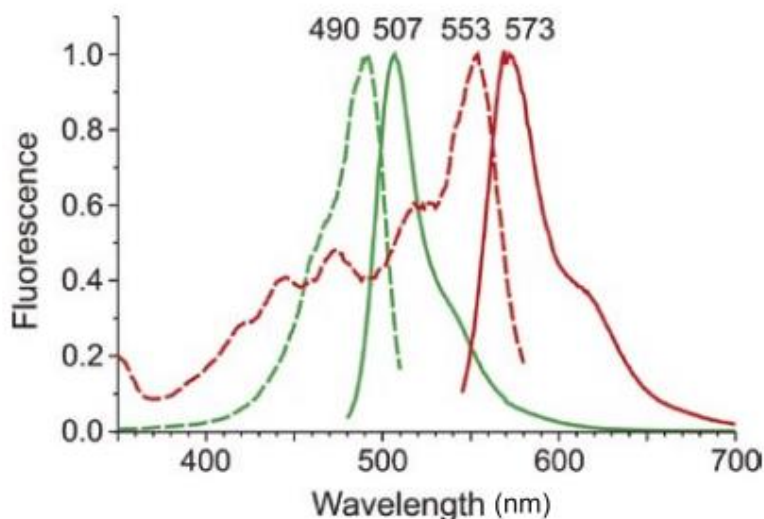


Figura 16-Espectros de excitação e de emissão das formas nativa e ativada da proteína Dendra2. É possível observar o máximo de excitação da forma nativa nos cerca de 490 nm, enquanto que a máxima emissão ocorre nos cerca de 507 nm. Já a forma ativada da proteína tem o seu máximo de excitação nos 553 nm, aproximadamente, e o seu máximo de emissão nos 573 nm. A verde estão representados os espectros de excitação e emissão da proteína nativa e a vermelho os da proteína ativada. Os espectros de excitação estão representados por linhas a tracejado, enquanto que os de emissão estão representados por linhas contínuas. Imagem retirada de ⁸⁵Chudakov et al (2007).

A Dendra2 é uma forma melhorada da proteína Dendra e o seu funcionamento e aplicações são equivalentes.⁸⁴⁻⁸⁶ As proteínas Dendra têm sido aplicadas na monitorização do movimento celular e no movimento de proteínas intracelularmente. A estabilidade na sua forma monomérica, a rápida maturação a 37 °C em células humanas, o alto contraste na foto-conversão, a intensa fluorescência em ambos os seus estados (nativo e ativado) são algumas das características que fazem destas proteínas as melhores candidatas a utilizar para as aplicações acima descritas.⁸⁴⁻⁸⁶

5.4 Transfecção estável

Uma transfecção estável ocorre quando um gene de interesse é introduzido e integrado no genoma das células, passando estas a expressá-lo de forma permanente e estável, geração após geração. Esta é realizada com o objetivo de obter células que expressem uma determinada proteína-alvo, nomeadamente em laboratório, com o intuito de facilitar e auxiliar estudos proteicos.

Este tipo de transfecção permite a obtenção de uma população celular estável que expressa a proteína pretendida. Para tal, um plasmídeo com o gene requerido (e também com um gene de resistência a um antibiótico) é introduzido nas células, o que constitui o passo de transfecção propriamente dito; seguido de um passo de seleção com antibiótico, que vai permitir a seleção das células que expressam o gene de resistência a esse antibiótico, sendo que as restantes morrerão.

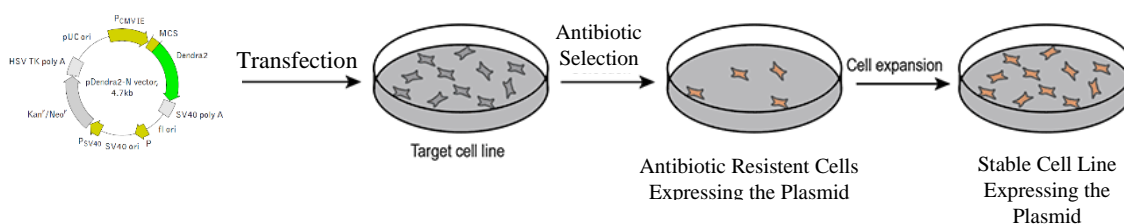


Figura 17- Ilustração esquemática da criação de uma linha celular que expressa uma proteína de interesse, através de uma transfecção estável. O primeiro passo é a introdução do plasmídeo com o gene-alvo nas células e o segundo passo é a seleção das células com antibiótico. As células que permanecerem vivas após este passo são as que expressam a proteína de interesse. O último passo é a amplificação destas células, que agora constituem uma linha celular estável que expressa o plasmídeo transfetado.

Dada a proximidade entre o gene de interesse e o gene de resistência ao antibiótico assume-se que as células que apresentam resistência ao antibiótico também integraram

no seu genoma celular o gene de interesse. Assim, é considerado que as células sobreviventes são as células de interesse e após amplificação dessa população, é obtida uma linha celular que expressa a proteína de interesse, tal como demonstrado no esquema da **figura 17**.

Esta foi a estratégia utilizada para a construção da linha celular que expressa a proteína de fusão Mob4-Dendra2, uma das ferramentas utilizadas ao longo deste estudo. Sendo que células hTERT RPE-1 foram transfetadas com o plasmídeo Mob4-Dendra2, integrando-o no seu genoma, e selecionadas com antibiótico (G-418) de forma semelhante à aqui explicada e também descrita no subcapítulo **6.5**. Esta população de células não é clonal, o que significa que cada célula pode expressar a proteína Mob4-Dendra2 com diferente intensidade, visto que a integração da sequência codificante para a proteína é inserida no genoma celular de forma aleatória. Isto também significa que o que é observado nestas células é, na verdade, uma sobre-expressão de Mob4, dado que as células expressam a proteína Mob4 endógena e a proteína Mob4-Dendra2.

Foram estas as principais estratégias utilizadas na criação das duas linhas celulares utilizadas ao longo deste estudo, de forma a visualizar e caracterizar a proteína Mob4. Estando estas estratégias já descritas, passo agora a descrever os materiais e métodos utilizados no decorrer deste trabalho.

6.MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Cultura de células

As células HeLa foram obtidas de Inês Baião, PhD, e cultivadas em meio DMEM+GlutaMax (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (GIBCO), suplementado com 10% soro fetal bovino, que contem fatores de crescimento necessários para a proliferação celular (GIBCO) e 1% penicilina-estreptomicina, antibióticos de amplo espectro de ação que auxiliam na prevenção de contaminações (GIBCO) a 37 °C e 5% CO₂.

As células hTERT RPE-1 foram obtidas de Inês Baião, PhD, e cultivadas em meio DMEM/F12+GlutaMax (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) (GIBCO), suplementado com 5% soro bovino fetal, que contem fatores de crescimento necessários para a proliferação celular (GIBCO) e 1% penicilina-estreptomicina, antibióticos de amplo espectro de ação que auxiliam na prevenção de contaminações (GIBCO) a 37 °C e 5% CO₂.

De forma a garantir a correta manutenção das células, estas foram transferidas e diluídas para novas placas sempre que atingissem uma confluência de 70-80%. A tripsina foi utilizada para degradar as ligações proteicas das células ao substrato, o que permitiu a sua suspensão e passagem para a nova placa. As diluições realizadas foram, maioritariamente, de 1:8 em meio suplementado, permitindo assim a expansão celular na nova placa.

6.2 Curvas de morte

Com o objetivo de determinar a concentração ideal de antibióticos a utilizar na seleção de células HeLa em experiências futuras (nomeadamente, na criação da linha celular HeLa Mob4-mAID-mCherry) foi testada a morte celular em função da dose de três antibióticos, utilizando-se várias concentrações destes. Ou seja, foi realizada uma curva de morte para cada um dos antibióticos, sendo estes a G-418 (antibiótico aminoglicosídeo de estrutura semelhante à gentamicina, que bloqueia a síntese de proteínas, inibindo a etapa de alongamento da cadeia polipeptídica), a higromicina (antibiótico aminoglicosídeo, que atua inibindo a síntese proteica) e a puomicina (antibiótico que

inibe a síntese proteica, causando a terminação prematura da cadeia polipeptídica durante a tradução).

As células HeLa foram tratadas com G-418, 50 mg/mL (CarlRoth); Higromicina B, 50 mg/mL (Invitrogen) e Puromicina, 10 mg/mL (AMRESCO), nas seguintes concentrações: G-418 e Higromicina B, 0 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL, 500 µg/mL, 600 µg/mL, 700 µg/mL, 800 µg/mL, 900 µg/mL e 10000 µg/mL; Puromicina, 0 µg/mL, 0.02 µg/mL, 0.04 µg/mL, 0.06 µg/mL, 0.08 µg/mL, 0.1 µg/mL, 0.2 µg/mL, 0.3 µg/mL, 0.4 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.6 µg/mL, 0.7 µg/mL, 0.8 µg/mL, 0.9 µg/mL, 1 µg/mL, 1.5 µg/mL, 2 µg/mL, 2.5 µg/mL, 3 µg/mL, 3.5 µg/mL, 4 µg/mL, 4.5 µg/mL, 5 µg/mL e 5.5 µg/mL. O meio com antibióticos foi mudado de dois em dois dias até confluência celular ou morte celular total.

6.3 Amplificação, extração e purificação de plasmídeos

Um dos plasmídeos essenciais para a construção da linha celular HeLa Mob4-mAID-mCherry-NeoR foi o pAL135, cuja amplificação foi necessária para alcançar a quantidade de plasmídeo pretendida. O plasmídeo pAL135 foi construído e fornecido pelo Professor Álvaro Tavares. Tendo, este, por base o plasmídeo AIO-mCherry (Addgene) (anexos, figura 1).

Para a amplificação recorreu-se ao uso de bactérias E.coli DH5α competentes (fornecidas por Inês Baião, PhD), que foram plaqueadas em LB-agar, contendo 100 µg/mL de ampicilina (este antibiótico permitiu a seleção das bactérias que incorporaram o plasmídeo, sendo que as restantes não sobreviveram). O plasmídeo pAL135 foi introduzido, nas bactérias competentes, utilizando o método de *heat shock* (permite a permeabilização temporária e entrada do plasmídeo nas bactérias), e estas foram incubadas *overnight*, a 37 °C. Uma colónia foi “picada” e amplificada em LB, com 200 µg/mL de ampicilina, *overnight*, a 37 °C e com agitação. Este processo permitiu a produção do plasmídeo pelas bactérias.

Por fim, é necessário extrair e purificar o DNA plasmídeo, o que foi realizado utilizando um kit QIAprep Spin Miniprep Kit (250).

6.4 Digestão enzimática e eletroforese em gel de agarose

De forma a confirmar a amplificação do pAL 135 foi realizada a digestão enzimática do plasmídeo, utilizando a enzima CLA I (Roche) e o tampão de enzima H (Roche) e as enzimas EcoR V (Promega) e Not I (Invitrogen), com o tampão D (Promega). Estas enzimas vão clivar o DNA em sítios específicos, gerando fragmentos de tamanho conhecido, que nos vão permitir afirmar que o plasmídeo foi corretamente amplificado.

Para visualizar o plasmídeo digerido e os respetivos fragmentos obtidos, as amostras foram corridas num gel 1% agarose, com 2 µL/mL de GelRed, a 75 Volt. O marcador de pesos moleculares utilizado foi o SM0331 Fementas 1 kBaseDNA Marker.

6.5 Construção da população celular hTERT RPE-1 Mob4-Dendra2

Células hTERT RPE-1 foram transfetadas com o plasmídeo pAL61 (Mob4-Dendra2), construído e amplificado pelo Professor Álvaro Tavares, tendo por base o plasmídeo pDendra2-N vector (Evrogen) (anexos, figura 2). Foram utilizados 2 µg de DNA plasmídeo, Lipofectamina 2000, reagente de transfecção constituído por moléculas lipídicas, que formam complexos com o DNA plasmídeo e permitem a sua entrada nas células (Invitrogen 1mg/mL) e meio Opti-MEM (GIBCO). Dois dias após transfecção, meio DMEM/F12 (GIBCO) com 500 µg/mL de G-418 (CarlRoth) foi adicionado às células (curva de morte realizada por Carolina Gonçalves, em anexos, figura 3), com o objetivo de selecionar as células que sofreram transfecção e incorporaram o plasmídeo. O meio com antibiótico foi trocado de dois em dois dias, durante 12 dias. As colónias de células sobreviventes foram amplificadas e mantidas em cultura sob pressão seletiva com 200 µg/mL de G-418 (CarlRoth).

6.6 Construção da linha celular clonal HeLa Mob4-mAID-mCherry-NeoR

Células HeLa foram transfetadas com os plasmídeos pAL135 e pAL145, construídos pelo Professor Álvaro Tavares, tendo por base os plasmídeos AIO-mCherry (anexos, figura 1) e pMK292, mAID-mCherry2-NeoR (Addgene) (anexos, figura 4), respetivamente. Foram utilizados 2 µg de DNA plasmídeo, Lipofectamina 2000, reagente de transfecção

constituído por moléculas lipídicas, que formam complexos com o DNA plasmídeo e permitem a sua entrada nas células (Invitrogen 1mg/mL) e meio Opti-MEM (GIBCO). Dois dias após transfecção, meio DMEM (GIBCO) com 700 µg/mL de G-418 (CarlRoth) foi adicionado às células, com o objetivo de selecionar as células que sofreram transfecção e incorporaram o plasmídeo. O meio com antibiótico foi trocado a cada dois dias. Após 12 dias, as células foram isoladas por diluição limitante, para dez placas de 96 poços (1 célula por poço, de forma a obter linhas celulares clonais). Foi permitida a amplificação das células por cerca de três semanas, até à formação de colónias, sendo que estas foram mantidas em meio condicionado com 700 µg/mL de G-418 (CarlRoth), trocado de dois em dois dias. As 203 colónias obtidas foram transferidas para placas de 24 poços e foi permitida a sua amplificação por alguns dias até, aproximadamente, 70-80% confluência. Por fim, os 162 clones sobreviventes foram recolhidos para extração de DNA e para armazenamento a -80 °C.

Após o descongelamento dos clones desejados, estes foram mantidos em cultura, sob pressão seletiva, em meio DMEM (GIBCO) e 200 µg/mL de G-418 (CarlRoth).

Nota: meio condicionado refere-se a meio DMEM (GIBCO) recolhido após contacto com células HeLa, filtrado e diluído (1:5) em meio DMEM fresco.

6.7 Extração de DNA genómico

O DNA foi extraído das células utilizando tampão de lise (1 mL Tris-HCl pH 8 1M, 2 mL EDTA 0.5M, 5 mL SDS 10% e 333 µL NaCl 3M, para 100 mL de volume final), que permite a lise celular, e proteinase K 5mg/mL, enzima que rapidamente digere proteínas, nomeadamente nucleases, impedindo assim a degradação do DNA, e precipitado com isopropanol e acetato de sódio 3M. Por fim, foi eluído em TE pH8 (50 µL Tris-HCl pH 8 1M e 100 µL EDTA 0.5M, para um volume final de 50 mL. A concentração das amostras foi medida usando o Thermo Scientific Invitrogen Nanodrop One Spectrophotometer with WiFi and Qubit 4 Fluorometer (sendo a concentração de DNA pretendida cerca de 100 ng/µL, para posterior utilização nas reações de PCR) e as amostras foram depois guardadas a 4 °C.

6.8 Rastreamento de clones por PCR e eletroforese em gel de agarose

A técnica de PCR (polymerase chain reaction) permite a rápida amplificação de fragmentos de DNA. No presente estudo esta foi utilizada com o objetivo de confirmar a inserção da construção mAID-mCherry2-NeoR a jusante do gene Mob4 nas células HeLa.

Numa reação de PCR são necessários vários componentes, todos indispensáveis. Os dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados), que são as bases azotadas que vão ser utilizadas para a construção das novas cadeias de DNA; os *primers forward* e *reverse*, que são complementares e se ligam nas extremidades das regiões a serem amplificadas, definindo assim a região de DNA a amplificar; o tampão, que fornece os íons e condições necessárias para a realização da reação; a Taq polimerase, uma polimerase termo-estável, que permite a construção das novas cadeias de DNA; e por fim, a cadeia-molde de DNA, a partir do qual vão ser amplificados os novos fragmentos de DNA. Estes reagentes são diluídos nas devidas concentrações em dH₂O.

As reações de PCR foram preparadas através de uma *master mix* cuja composição e concentração final de dos reagentes foi a seguinte: 200 µM dNTPs (fornecido por Inês Baião, PhD), 1 mM *primer forward* (fornecido por Inês Baião, PhD), 1 mM *primer reverse* (fornecido por Inês Baião, PhD), tampão DreamTaq Polimerase 10X, com 20 mM MgCl₂ (diluído 10x) (ThermoFisher), DreamTaq Polimerase 5 U/µL (foram utilizados 0.03 µL por reação) (ThermoFisher) e 100 ng de DNA, num volume final de 10 µL. Na **tabela 3** encontram-se os *primers* utilizados e a sua descrição.

As reações ocorreram através de um passo de desnaturação inicial a 95 °C durante 1 minuto, seguida de 40 ciclos de desnaturação das cadeias de DNA a 95 °C durante 30 segundos, *annealing* dos *primers* a 60 °C por 30 segundos e extensão das cadeias de DNA a 72 °C durante 2 minutos, por fim ocorreu um passo de extensão final a 72 °C durante 5 minutos. Após a finalização deste processo as amostras foram conservadas a 4 °C. As reações de PCR foram realizadas recorrendo a um termociclador, que permite a rápida alteração da temperatura nos tempos programados para a reação.

Tabela 3-Descrição dos *primers* utilizados para rastreo dos clones Mob4-mAID-mCherry-NeoR, em células HeLa

<i>Primer</i>	<i>Sentido</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>	<i>Observações</i>
priAL20	<i>Foward</i>	cgttggctaccctgatatt	Para amplificação de inserção por CRISPR antes de NeoR, hibridiza em NeoR.
priAL22	<i>Reverse</i>	ttggcaccttcagcttgg	Para amplificação de inserção por CRISPR antes de mAID, hibridiza em mCherry2
priAL44	<i>Foward</i>	tgaattcctgcagccccggggatc	Para amplificação de Mob4 (CAGGAGTTTTCAATCGCCTCTAGTGGA), sequência homóloga I <i>foward</i>
priAL47	<i>Reverse</i>	cgctctagaactagtggatc	Para amplificação de Mob4 (AGAAGGGGTGGACAGGGCAGGTTCCAG), sequência homóloga II <i>reverse</i>

De forma a visualizar os fragmentos de DNA amplificados, as amostras foram corridas num gel 1% agarose, com 2 µL/mL de GelRed, a 75 Volt. O marcador de pesos moleculares de DNA utilizado foi o SM0331 Fementas 1 kBaseDNA Marker.

6.9 Preparação de lisados proteicos

Com o objetivo de extrair, para posterior análise, as proteínas das células foram realizados lisados proteicos. Estes foram preparados com *loading buffer* 4X (40% glicerol, 400 mM β-mercaptoetanol, 10% SDS, 0.4% azul de bromofenol, 200 mM Tris-HCl 1M pH 6.8) e fervidos a 100 °C, durante 10 minutos, o que permitiu a lise celular e desnaturação proteica. As amostras foram depois diluídas em 1:2 em TBS 1X e mantidas a 4 °C.

6.10 SDS-PAGE e Western Blotting

A técnica de Western Blot é utilizada para detetar proteínas específicas a partir de lisados de proteína total provenientes de células. Esta técnica permite assim confirmar a expressão de uma proteína de interesse nas células.

Estando preparados os lisados proteicos, as amostras são corridas em géis SDS-PAGE (*Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), onde as proteínas são separadas de acordo com seu tamanho. Após a separação, as proteínas são transferidas do gel para uma membrana (de PVDF ou de nitrocelulose). Uma vez que a transferência esteja completa, a membrana carrega agora todas as bandas de proteína que estavam originalmente no gel. Em seguida, a membrana passa por um tratamento de bloqueio, que impede a ocorrência de reações inespecíficas. A membrana é então incubada com um anticorpo primário, que se liga especificamente à proteína de interesse. Após a incubação, qualquer anticorpo primário não ligado é lavado e a membrana é incubada novamente, mas desta vez com um anticorpo secundário que reconhece e se liga especificamente ao anticorpo primário. O anticorpo secundário está ligado a uma enzima, a HRP (*horseradish peroxidase*), que permite que seja facilmente detetado e visualizado. Isto acontece, pois, na presença de peróxido de hidrogénio, esta enzima utiliza o luminol como substrato catalisando uma reação química que produz luz.

As amostras proteicas foram separadas por SDS-PAGE (*Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), em géis a 12%, utilizando-se o marcador de pesos moleculares Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standarts e aplicando-se uma corrente de 12 mA por gel para o *stacking* (no *stacking* gel) das amostras e 25 mA por gel para a separação destas (no *resolving* gel).

A transferência foi realizada para membranas de PVDF (equilibradas em metanol por 1 minuto) ou para membranas de nitrocelulose a 300 mA por cerca de 60 minutos.

As membranas foram bloqueadas em 10% leite por 60 minutos, incubadas com o anticorpo primário *overnight*, a 4 °C e com o anticorpo secundário por 1h-2h, à temperatura ambiente. Os anticorpos primários utilizados foram os seguintes: anti-Mob4 16E2 em *mouse* (Santa-Cruz), diluição 1:200; anti- γ -tubulina GTU-88 em *mouse* (Sigma, monoclonal, clone GTU-88), diluição 1:1000, e anti-ciclina B1 em *mouse* (PharMingen, monoclonal), diluição 1:1000. O anticorpo secundário utilizado foi o anti-*mouse* em *rabbit*, HRP (*horseradish peroxidase*) *conjugated* (Jackson ImmunoResearch Laboratories), numa diluição de 1:1000.

A visualização da proteína foi conseguida através da incubação da membrana com uma solução de ECL (*enhanced chemiluminescence*, que contém luminol) e peróxido de hidrogénio, e, posterior, revelação do hiperfilme (CytivaAmersham Hyperfilm), em sala escura.

O *stripping* da membrana foi realizado a 65 °C, em agitação, durante 15-30 minutos, numa solução, contendo 0,1 M β -mercaptoetanol. O bloqueio da membrana foi realizado com 10% leite por cerca de 30 minutos e, de seguida, a membrana foi incubada com os anticorpos de acordo com o já descrito acima.

6.11 Fixação de células e montagem de slides

A fixação de células permite a criação de preparações definitivas que podem ser armazenadas e utilizadas por longos períodos de tempo.

As células foram sempre fixadas com metanol:acetona (1:1) a -20 °C, por 2 minutos ou com 3,7% formaldeído por 10 minutos. As lavagens foram realizadas com PBS 1X (Sigma P4417-100 TAB) e com PBS 1X/0,05% Tween 20, por cinco minutos cada. O DNA foi corado com Dapi 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (um corante que intercala com o DNA, permitindo a sua visualização), por 10 minutos, no escuro. A lamela foi colocada sobre uma gota de meio de montagem Mowiol e a preparação foi selada com verniz. As preparações foram guardadas no escuro, a 4 °C, para posterior visualização ao microscópio.

6.12 Microscopia

As preparações de células foram visualizadas num microscópio de fluorescência, Zeiss Microscope Axio Imager Z2, sendo as fotografias capturadas com uma câmara a preto e branco e, posteriormente, tratadas e melhoradas utilizando o *software* FIJI (Fiji Is Just Image J).

6.13 Imunofluorescência

A imunofluorescência é um método que utiliza anticorpos quimicamente marcados com corantes fluorescentes para visualizar proteínas em microscopia de fluorescência. O primeiro passo na realização desta técnica é plaquear as células sobre lamelas e permitir a sua aderência *overnight*. Depois prossegue-se fixando, permeabilizando e bloqueando as células, de modo a permitir a entrada dos anticorpos nas células e sua ligação específica à proteína de interesse. De seguida, as células são incubadas com o anticorpo primário que reconhece e se liga à proteína de interesse e depois incubadas com o anticorpo secundário que reconhece e se liga ao anticorpo primário. Por fim, segue-se a incubação com um corante de DNA e a montagem da preparação.

As células foram fixadas com metanol:acetona ou formaldeído como descrito na secção **6.11**, permeabilizadas com 0,5% Triton X-100 em PBS 1X e bloqueadas com 2% BSA (*Bovine Serum Albumin*), 2% FBS (*Fetal Bovine Serum*) em PBT (0,05 Tween 20 em PBS 1X) . As células foram incubadas com anticorpos primários por uma hora, numa diluição de 1:200 ou 1:1000, em câmara húmida e, de seguida, com anticorpos secundários por 30 minutos, numa diluição de 1:1000, em câmara húmida e escura. Na **tabela 4** encontram-se os anticorpos primários e secundários utilizados nas imunofluorescências realizadas e a sua respetiva descrição. O DNA foi corado com Dapi 0,25 µg/mL e as preparações montadas com descrito no subcapítulo **6.11**.

Tabela 4-Anticorpos primários e secundários utilizados nas imunofluorescências

Anticorpos primários		
Nome	Descrição	Observações
Anti-giantina	Anti-giantina, em <i>rabbit</i>	BioLegend (Poly 19243), diluição utilizada 1:1000
DM1A	Anti- α -tubulina, em <i>mouse</i>	Sigma #T-9026, monoclonal (clone DM1A), diluição utilizada 1:200
Anticorpos secundários		
Nome	Descrição	Observações
Alexa Fluor 594	Anti- <i>rabbit</i> , em <i>goat</i>	Molecular Probes (A11037), diluição utilizada 1:1000

Alexa Fluor 488	Anti <i>rabbit</i> , em <i>goat</i>	Invitrogen (A11034), 1:1000
Alexa Fluor 594	Anti- <i>mouse</i> , em <i>goat</i>	Molecular Probes (A11005), diluição utilizada 1:1000

6.14 Tratamento com *Brefeldin A*

A *Brefeldin A* é uma droga que promove a dissolução do Golgi, visto que inibe o transporte de vesículas para este organelo. Os efeitos observados por esta droga são, no entanto, reversíveis, pois a re-montagem do Golgi pode ocorrer.

Assim, células HeLa Mob4-mAID-mCherry-NeoR foram tratadas com 0,5 µg/mL *Brefeldin A* (fornecida por Inês Baião, PhD) por 2, 5, 8 e 10 minutos (de modo a otimizar este protocolo e perceber qual o tempo que em o efeito desta droga é máximo).

6.15 iRNA (RNA *interference*)

iRNA é um método de silenciamento pós-transcricional de genes específicos. Pequenas moléculas de RNA complementares a RNAs mensageiros são introduzidas nas células, o que vai conduzir à degradação deste RNAs mensageiros e inibir a síntese e expressão proteica na fase de tradução. iRNA é geralmente utilizado para a determinação dos efeitos causados nas células pela depleção de uma proteína específica.

Células hTERT RPE-1 Mob4-Dendra2 e HeLa Mob4-mAID-mCherry-NeoR foram transfetadas com Oligo 5 50 µM duplex, siRNA anti-Mob4 (fornecido por Álvaro Tavares). As células foram transfetadas usando o sistema de reagentes Lipofectamina 200 (Invitrogen 1mg/mL) e meio Opti-MEM (GIBCO), sendo que meio suplementado fresco foi adicionado às células cerca de 2 horas e 30 minutos após transfecção. Dois dias após transfecção células foram recolhidas para a preparação de lisados proteicos ou para fixação. Foi também realizado o *split* das células, sofrendo estas uma diluição de 1:3, e estas foram re-transfetadas de acordo com o procedimento descrito acima. Por fim, dois dias após re-transfecção as células foram recolhidas para preparação de lisados proteicos, para fixação e observação ao microscópio.

6.16 Sincronização com DTB (*double thymidine block*) e bloqueio em mitose

O duplo bloqueio de timidina é comumente utilizado para alcançar sincronização celular. Esta técnica permite que células em cultura realizem o ciclo celular de forma sincronizada, ou seja, todas as células se encontram na mesma fase deste ciclo ao mesmo tempo. A sincronização celular é amplamente utilizada no estudo de mecanismos que envolvem a regulação da progressão do ciclo celular ou para estudar eventos específicos do ciclo celular.

Níveis elevados de timidina inibem a replicação de DNA, causando a paragem do ciclo celular na fase S. O duplo bloqueio com timidina assegura a paragem mais uniforme das células no início da fase S, permitindo a sincronização celular a partir dessa fase aquando libertação da timidina.

Células HeLa Mob4-mAID-mCherry-NeoR foram bloqueadas com 2 mM Timidina (Sigma) por 24 horas, seguido de libertação por adição de meio fresco durante 12 horas, e novamente bloqueadas com 2 mM Timidina por 24 horas. Por fim, as células foram libertadas por adição de meio fresco e recolhidas de hora a hora, das 0 às 20 horas, para preparação de extratos proteicos, de forma a permitir a realização de um ciclo celular completo.

Somando ao DTB, células foram também tratadas e incubadas com 50 ng/mL de nocodazole (fornecido por Cláudia Florindo) durante 12 horas (droga que promove a despolimerização de microtúbulos, levando à paragem do ciclo em mitose) ou com 5 μ M de STLC (*S-trityl-L-cysteine*) durante 12 horas (droga que inibe a proteína cinesina 5, uma proteína motora essencial para a mitose, conduzindo assim à paragem do ciclo celular em mitose), de modo a ocorrer bloqueio sincronizado em mitose por dois mecanismos distintos. Estas células foram também recolhidas para preparação de lisados proteicos.

7.RESULTADOS

7.1 Determinação da concentração de G-418, Higromicina B e Puomicina que provoca morte celular total no período de uma semana

Com o objetivo de determinar qual a concentração de antibiótico a utilizar quando a seleção de células HeLa transfetadas (para criação de linha celular clonal AID) foram realizados testes de dose-resposta, utilizando diversas concentrações de três antibióticos, G-418, Higromicina B e Puomicina. Desta forma, foi possível determinar qual a concentração ideal destes antibióticos a utilizar para provocar morte celular total em cerca de 8-9 dias. Os resultados obtidos estão representados sob a forma de uma curva de morte, na **figura 18** e **figura 5 de Anexos**.

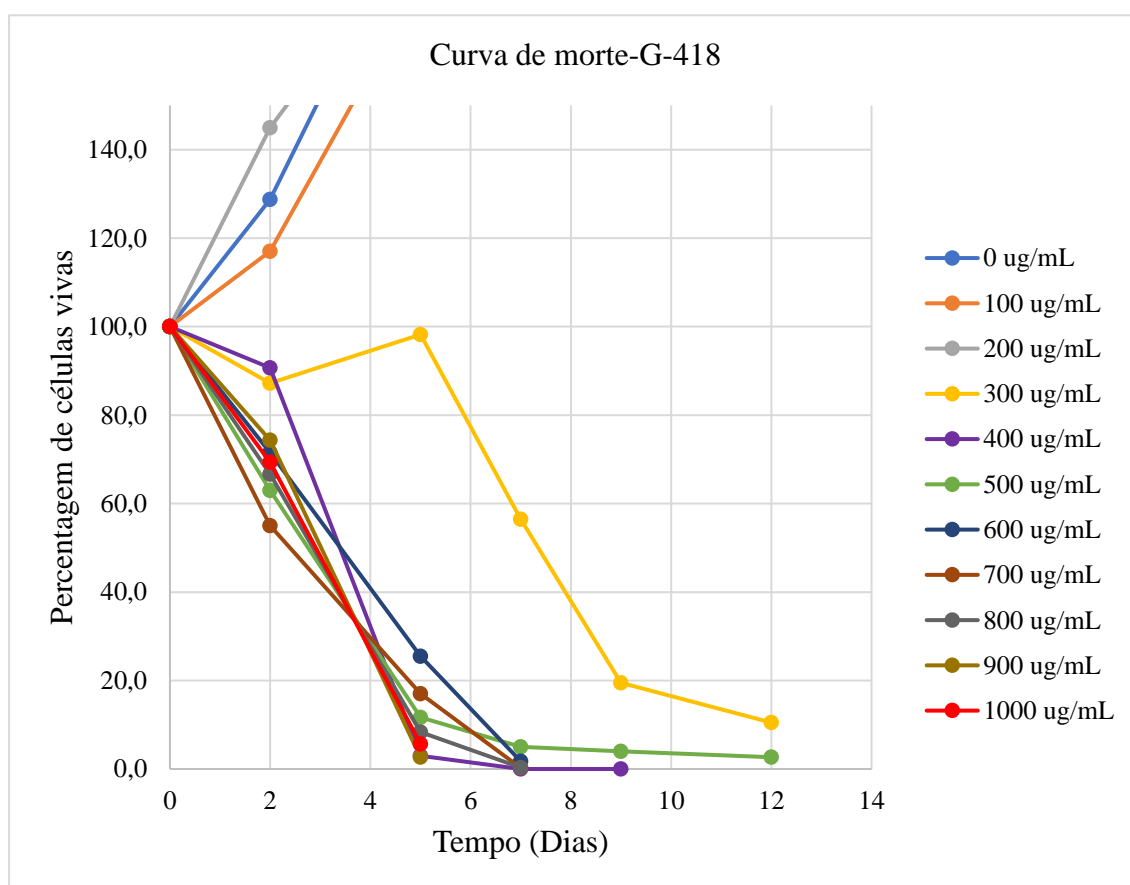


Figura 18-Curvas de morte para a G-418, em células HeLa. No gráfico estão representadas as curvas de morte para as concentrações 0 a 1000 µg/mL de G-418.

Era espectável que a morte celular causada por concentrações intermédias de G-418 fosse gradual ao longo do tempo devido ao lento mecanismo de ação deste antibiótico (inibição da síntese proteica), no entanto observou-se uma morte mais acentuada nos primeiros dias de tratamento. Ainda assim, de acordo com os resultados obtidos, quer a concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$, quer a de 700 $\mu\text{g/mL}$ mostraram ser adequadas para atingir morte celular total em cerca de 8 dias. Assim, 700 $\mu\text{g/mL}$ foi a concentração de G-418 selecionada a utilizar futuramente.

Apesar de o uso de Higromicina B e Puromicina não ter sido necessário nos futuros ensaios, foi determinado que as concentrações de 700-800 $\mu\text{g/mL}$ e 0,2-0,3 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente, seriam os mais adequados a utilizar em células HeLa (em anexos).

7.2 Confirmação da amplificação do plasmídeo pAL135

O plasmídeo pAL135 (figura 1, em anexos), necessário para a construção da linha celular clonal que expressa o sistema AID, foi amplificado e purificado. A confirmação da sua amplificação e purificação foi realizada por digestão enzimática. O resultado da digestão enzimática está presente na **figura 19**.

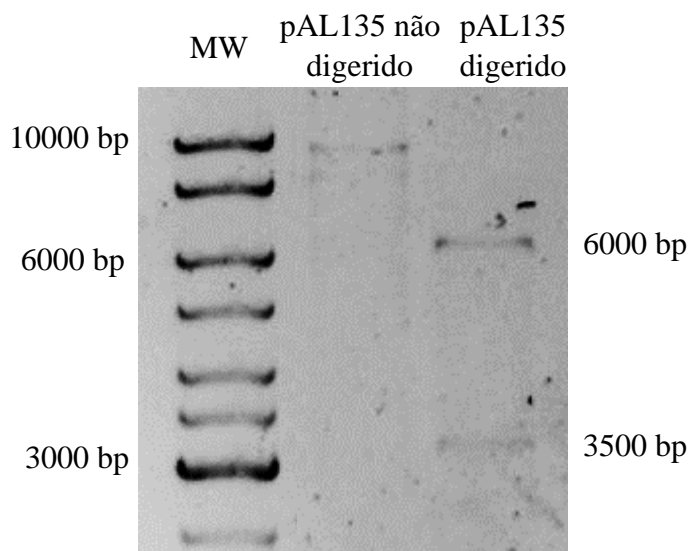


Figura 19-Resultado da digestão enzimática do plasmídeo pAL135, utilizando as enzimas de restrição EcoR V e Not I. São observados dois fragmentos de DNA, nos pesos moleculares 6000 bp e 3500 bp. MW-marcador de pesos moleculares. O plasmídeo não digerido foi utilizado como controlo para a confirmação da reação de digestão.

Os fragmentos obtidos na digestão enzimática mostrada acima, dois fragmentos nos pesos moleculares 3500 bp e 6000 bp, estão de acordo com o esperado. É então possível concluir que foi possível a amplificação do plasmídeo pAL135, cuja concentração é de 141 ng/ μ L (valor obtido utilizando o equipamento Thermo Scientific Invitrogen Nanodrop One Spectrophotometer with WiFi and Qubit 4 Fluorometer).

Tendo determinado a concentração a usar de G-418 e obtido o plasmídeo requerido procedeu-se então à construção da linha celular clonal contendo o sistema AID, em células HeLa.

7.3 Rastreamento dos clones HeLa Mob4-mAID-mCherry-NeoR por PCR

A linha celular HeLa Mob4-mAID-mCherry-NeoR foi criada como descrito no subcapítulo 6.6, tendo em vista a obtenção de um sistema de rápida depleção da proteína Mob4 em células HeLa. Para tal efeito a integração do sistema AID é requerida em ambos os alelos do gene, pois só assim será possível a depleção completa da proteína nas células. No entanto, a probabilidade de inserção deste sistema em ambos os alelos é bastante baixa, valor que depende de gene para gene, assim a maioria dos clones obtidos vão ser apenas monoalélicos para a inserção e não bi-alélicos, como é pretendido.

De modo a determinar se os clones eram monoalélicos ou bi-alélicos para a inserção foi realizado um rastreamento por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) aos 162 clones obtidos, de acordo com o protocolo descrito no subcapítulo 6.8. Cada clone foi então testado para três reações de PCR, sendo isto conseguido através da utilização de três pares de *primers* (os quatro *primers* utilizados estão descritos na tabela 3, subcapítulo 6.8): o par de *primers* A (priAL44 e priAL47) amplifica o último exão do gene Mob4 e uma pequena sequência a jusante do gene, gerando um fragmento de cerca de 1400 bp (produto de PCR A), quando não inserção da construção do sistema AID (quando a inserção da construção o fragmento terá cerca de 4000-5000 bp, logo não será amplificado); o par de *primers* B (priAL44 e priAL22) amplifica o fragmento mAID, gerando um fragmento com cerca de 1200 bp (produto de PCR B); e o par de *primers* C (priAL20 e priAL47) amplifica o fragmento NeoR (gene de resistência à G-418), gerando também um fragmento com cerca de 1200 bp (produto de PCR C); como ilustrado na **figura 20**.

Portanto, o pretendido será a amplificação dos fragmentos B e C, e a não amplificação do fragmento A (figura 20), resultado que nos comprovará a inserção bi-alélica no clone testado.

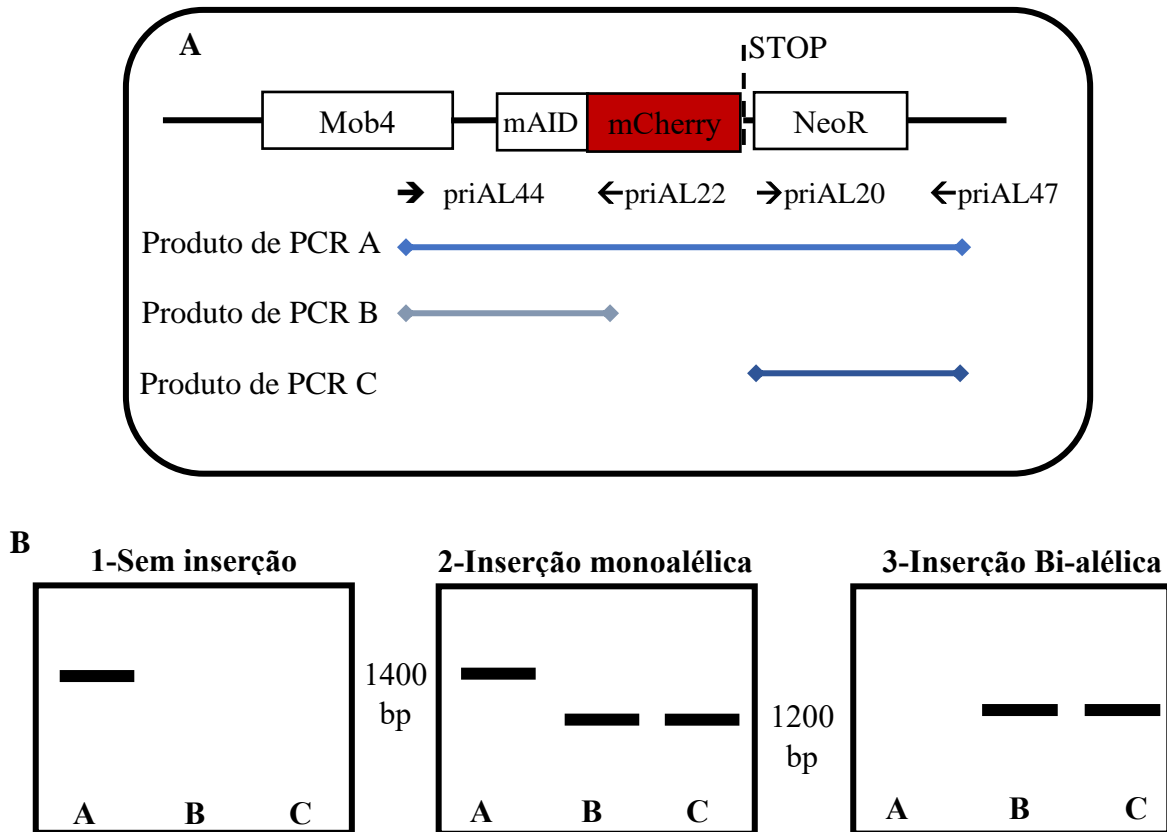


Figura 20-Estratégia utilizada para o rastreamento dos clones HeLa Mob4-mAID-mCherry-NeoR. (A) Representação esquemática da inserção do sistema AID, a jusante do gene Mob4. O sistema é composto pelo mini AID, pelo repórter *cherry* e pelo gene de resistência à gentamicina. Utilizando três pares de *primers* é possível a identificação dos clones que inseriram este sistema em ambos os alelos ou apenas num alelo, através de PCR. (B) Esquema exemplo dos possíveis resultados obtidos para cada clone, após PCR, em gel de agarose. Sendo que cada clone irá gerar apenas um dos três possíveis resultados apresentados. 1-aquando a não inserção do sistema AID é esperado apenas a obtenção da amplificação do fragmento A; 2-na presença de linhas clonais monoalélicas vai ser observada a amplificação dos três fragmentos, o A originado a partir do alelo sem inserção e os fragmentos B e C originados a partir do alelo com inserção do sistema AID; 3-por fim, linhas clonais bi-alélicas originarão apenas amplificação dos fragmentos B e C. A-A-produto de PCR A, B-produto de PCR B, C-produto de PCR C.

Por questões de simplificação e de forma a otimizar o tempo deste processo, os clones foram inicialmente apenas rastreados para a presença ou ausência do produto de PCR A, realizando-se a reação de PCR apenas utilizando o par de *primers* A (figura 21 e figura 6, anexos). Como controlo negativo foram realizadas as reações sem cadeia-molde e

como controlo positivo as reações foram realizadas com DNA da linha celular parental (células HeLa, sem inserção da construção). O objetivo era a obtenção de clones em a amplificação deste fragmento não ocorresse, procurando-se, portanto, a ausência do produto de PCR A, o que significaria que o respetivo clone testado era bi-alélico para a inserção do sistema AID. Quando tal ocorria, o potencial clone bi-alélico era então testado com os três pares de *primers* (figura 7, anexos) para a confirmação da ausência do fragmento endógeno (sem inserção) e para a inserção quer do fragmento mAID, quer do fragmento de resistência. 162 clones foram testados com o par de *primers* A e, desses, 27 foram também testados com os três pares de *primers* (sendo que não foi possível apurar a natureza de dois dos clones, devido ao facto de a amostra de DNA destes ser insuficiente para a realização das reações necessárias).

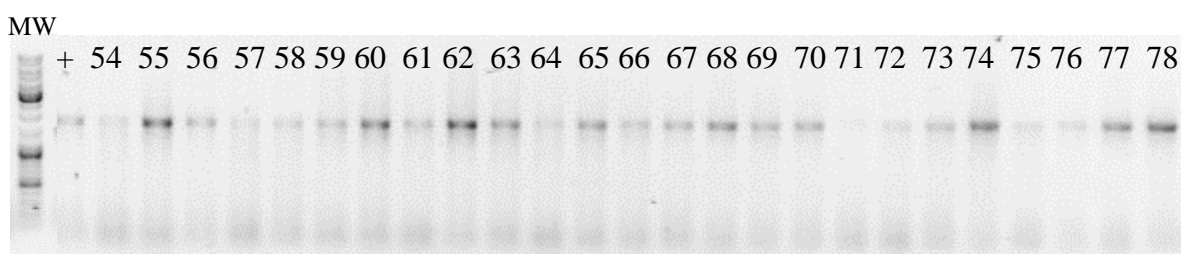


Figura 21-Rastreio dos clones 54-78, a título de exemplo, utilizando apenas o par de *primers* A. Gel de agarose exemplificativo do resultado obtido pela reação de PCR, utilizando o par de *primers* A. A maioria dos clones apresenta o produto de PCR A, excluindo-os assim como clones bi-alélicos. Este processo foi repetido para os 162 clones gerados, obtendo-se resultados semelhantes ao aqui apresentado. MW refere-se ao marcador de pesos moleculares. + refere-se ao controlo positivo, reações realizadas com DNA da linha celular parental (células HeLa, sem inserção da construção). Os fragmentos observados encontram-se nos 1400 bp, aproximadamente.

Feito o rastreio de todos os clones, não foi possível encontrar um clone com a inserção nos dois alelos, pois todos os clones testados apresentaram amplificação do produto de PCR A (o fragmento endógeno, sem inserção). Dada a baixa eficácia de inserção do sistema AID seria necessário um número mais elevado de clones para atingir o objetivo de produzir uma linha celular clonal bi-alélica. Visto não ter sido possível encontrar um clone bi-alélico não se procedeu à transfecção da linha celular com a OsTIR1, como era planeado inicialmente. No entanto, apesar de não ser possível utilizar os clones monoalélicos para a depleção total da proteína Mob4, através do sistema AID, é possível recorrer aos clones monoalélicos para visualizar a proteína Mob4 intracelularmente e caracterizá-la quanto à sua localização. Para esse efeito foi selecionado um clone

monoalélico (o qual vou chamar de CRAL 30) para realizar as experiências futuras no que respeita à caracterização da Mob4 em células HeLa.

A linha clonal monoalélica escolhida, CRAL 30, foi novamente testada por PCR, utilizando os três pares de *primers* (A, B e C), de forma da confirmar, a inserção da construção AID num dos alelos. A obtenção dos três produtos de PCR (A, B e C) comprovou a inserção desejada em um dos alelos do gene (figura 22).

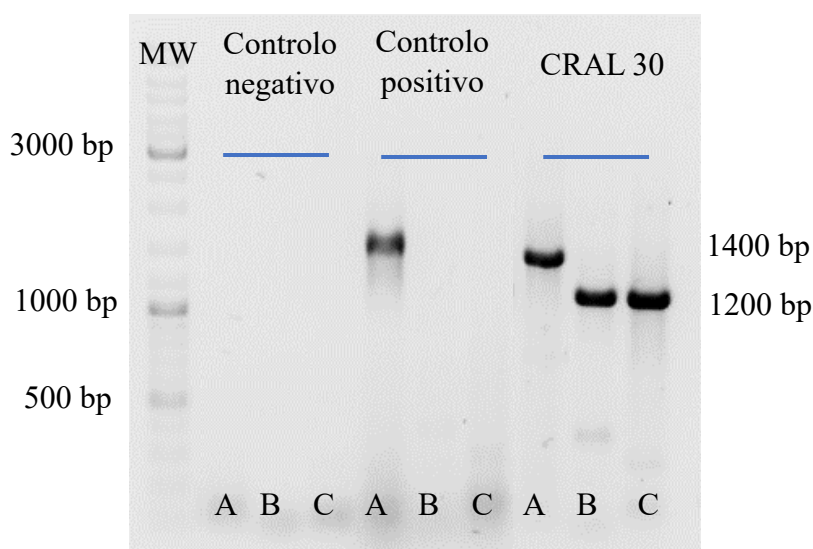


Figura 22-As células CRAL 30 são monoalélicas para a inserção do sistema AID. Rastreo, por PCR, das CRAL 30 revela que a linha celular clonal é monoalélica para a inserção da construção (mAID-mCherry-NeoR) a jusante do gene Mob4. Este clone foi testado com os três pares de *primers* A, B e C, revelando amplificação dos três fragmentos, o que significa que possui um alelo endógeno (sem inserção) e um alelo com inserção. MW refere-se ao marcador de pesos moleculares. Controlo negativo refere-se às reações de PCR sem cadeia-molde e controlo positivo refere-se às reações realizadas com DNA da linha celular parental (células HeLa, sem inserção da construção).

7.4 Confirmação da expressão das proteínas Mob4-mAID-mCherry, em HeLa, e Mob4-Dendra2, em hTERT RPE-1, por Western Blot

Em adição à confirmação da inserção da sequência mAID-mCherry-NeoR, a jusante do gene Mob4, por PCR foi também realizada a confirmação da expressão proteica (proteína Mob4-mAID-mCherry; gene de resistência ao antibiótico é traduzido em proteína independente, não estando em fusão com a restante construção, devido ao codão STOP

antes da sequência de resistência, ver figura 20 A) por Western Blot em lisados proteicos das células CRAL 30 (figura 23). Sendo utilizado como controlo extratos proteicos da linha celular parental (células HeLa, sem inserção da construção).

As células CRAL 30 expressam a proteína Mob4 endógena, proveniente do alelo sem inserção e a proteína Mob4-mAID-mCherry originada a partir do alelo com inserção, tal como se pode confirmar, na **figura 23**. A presença de proteína nos 26 kDa corresponderá à proteína endógena, enquanto que a proteína presente nos 65 kDa, constitui a proteína Mob4-mAID-mCherry. Estes resultados comprovam a expressão da proteína em fusão com o sistema AID nas células CRAL 30, tal como era desejado.

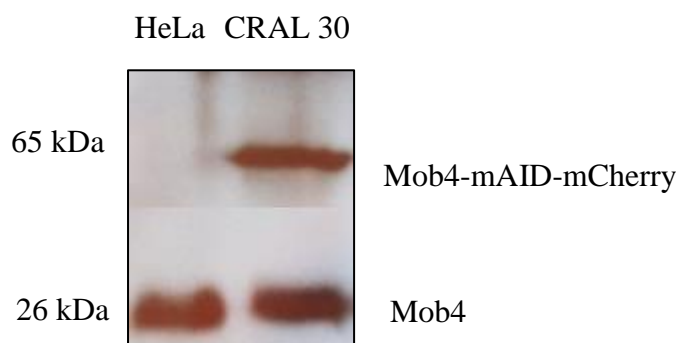


Figura 23-As células CRAL 30 expressam a proteína Mob4-mAID-mCherry. A linha celular CRAL 30 expressa a proteína Mob4 endógena, detetada nos 26 kDa, e a proteína Mob4 em fusão como sistema AID (aproximadamente, 7-8 kDa) e o repórter *cherry* (aproximadamente, 30 kDa), detetada nos 64-65 kDa. Como controlo foram utilizados extratos proteicos da linha celular parental (células HeLa, sem inserção da construção). A expressão da proteína foi determinada por Western Blot; foi utilizado o anticorpo primário 16E2, anti-Mob4.

De forma semelhante, foi confirmada a expressão da proteína Mob4-Dendra2, na população de células hTERT RPE-1 (figura 24), gerada como descrito nos subcapítulos **5.4** e **6.5**, com o objetivo de visualizar e caracterizar a proteína Mob4 na linha celular RPE-1. Sendo utilizado como controlo extratos proteicos da linha celular parental (células RPE-1, não transfetadas com a proteína Mob4-Dendra2).

A população celular RPE-1 Mob4-Dendra2 expressa a proteína Mob4 endógena, proveniente do gene endógeno e a proteína Mob4-Dendra2, originada a partir da inserção da sequência genómica Mob4-Dendra2 nas células. Tal é comprovado pela presença de proteína nos 26 kDa, correspondente à proteína endógena e pela presença de proteína nos 52 kDa, aproximadamente, que representa a proteína de fusão Mob4-Dendra2, visível na

figura 24. Este resultado constitui a confirmação necessária para afirmar que a população celular desejada foi construída com sucesso.

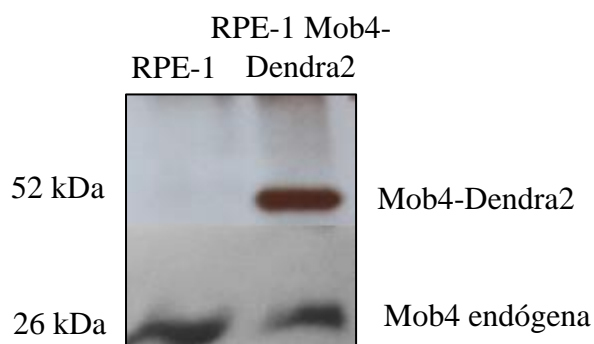


Figura 24- A proteína Mob4-Dendra2 é expressa na população de células RPE-1 criada. A população de células RPE-1 Mob4-Dendra2 expressa a proteína Mob4 endógena, detetada nos 26 kDa, e a proteína Mob4 em fusão com a proteína Dendra2 (aproximadamente, 26 kDa), detetada nos 52 kDa. Como controlo foram utilizados extratos proteicos da linha celular parental (células RPE-1, não transfetadas com a proteína Mob4-Dendra2). A expressão da proteína foi determinada por Western Blot; foi utilizado o anticorpo primário 16E2, anti-Mob4.

Estando então concebidas as duas ferramentas requeridas para este estudo, foi possível começar a caracterização da localização intracelular de proteína Mob4 em células humanas, HeLa e RPE-1.

7.5 A proteína Mob4 forma agregados citoplasmáticos em células interfásicas em HeLa e em RPE-1

De referir que ambas as populações de células, CRAL 30 e RPE-1 Mob4-Dendra2, foram observadas tanto por microscopia em tempo real, tanto fixadas, sendo que em ambas as condições estas células apresentam presença de fluorescência, o que valida e confirma também a expressão das proteínas de fusão Mob4-mAID-mCherry e Mob4-Dendra2, respetivamente. Mais do que isso é possível observar a presença de marcação específica destas proteínas no citoplasma celular, **figuras 25 e 26.**

Para além das CRAL 30, foram observadas quatro linhas clonais monoalélicas para a inserção Mob4-mAID-mCherry por microscopia em tempo real (dados não mostrados), de modo a comprovar que a fluorescência observada era semelhante em todas estas e a validar a marcação de Mob4 observada nas células CRAL 30. De facto, os cinco clones

observados apresentavam um padrão semelhante de fluorescência, pelo que se pode assumir que a marcação observada é de facto representativa da proteína Mob4 e não um

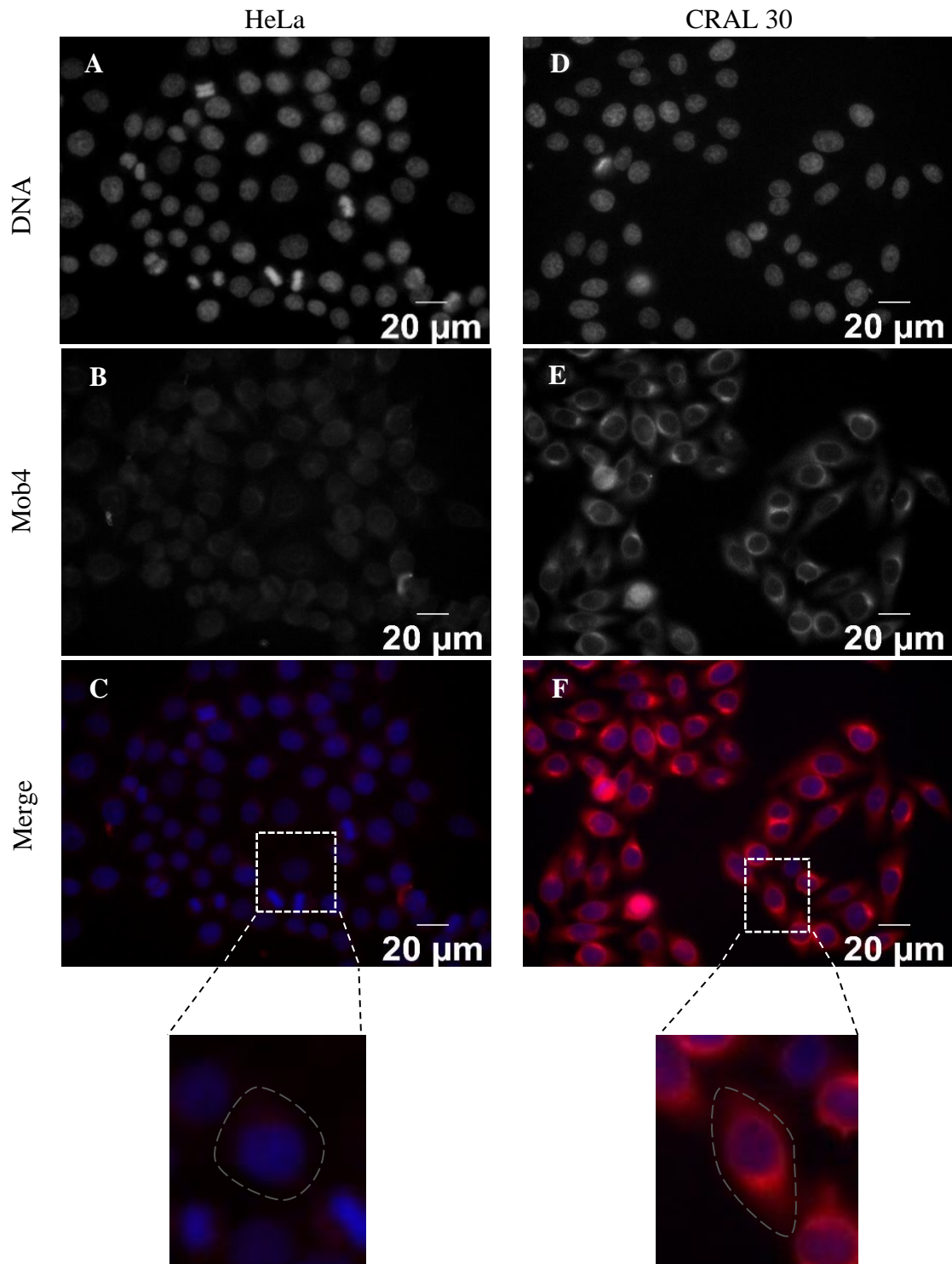


Figura 25-As células CRAL 30 apresentam marcação para a Mob4. (A-C) Células HeLa, linha celular parental, foram usadas como controlo. (D-F) É possível visualizar fluorescência citoplasmática representativa da proteína Mob4 em todas as células da linha celular CRAL 30. As células foram fixadas com metanol:acetona e o DNA corado com DAPI, 0,25 µg/mL. Azul-DNA, vermelho-Mob4.

artefacto ou uma anomalia provocada por uma população clonal aberrante.

Células HeLa foram utilizadas como controlo negativo, de modo a descartar falsos resultados. Estas apresentavam presença de autofluorescência pouco intensa (figura 25), o que possibilita a atribuição da fluorescência observada nas células CRAL 30 como pertencente à proteína Mob4. No caso das células RPE-1 foram utilizados dois controlos. A linha parental de células RPE-1, onde é possível observar autofluorescência intensa com marcação dos nucléolos, **figura 26, setas azuis** (descartando esta marcação como relacionada à localização de Mob4) e células RPE-1 Dendra2, que expressam apenas a proteína Dendra2. Estas células foram utilizadas como controlo na observação de células RPE-1 Mob4-Dendra2 (figura 26), de modo a verificar que a fluorescência específica observada não é provocada pelo sistema utilizado. Ou seja, não é um artefacto causado pela proteína Dendra2 e sim representativa da localização da Mob4 em células RPE-1. De facto, estas apresentam fluorescência, no entanto nenhuma marcação específica é observável.

A localização de Mob4 observada nas células CRAL 30 é homogénea, visto estarmos na presença de uma linha celular clonal e a proteína expressada é apenas a proteína Mob4 endógena. Isto traduz-se num padrão de localização de Mob4 que está presente em todas as células desta população e que apresentam uma intensidade de fluorescência relativa idêntica entre si (figura 25). No entanto, o mesmo não se verifica nas células RPE-1. A população de células RPE-1 não é uma população clonal e é constituída por células que estão a sobre-expressar a proteína Mob4 (pois à expressão da proteína Mob4 endógena, soma-se também a expressão da proteína Mob4-Dendra2). Estes dois fatores fazem desta população celular uma população heterogénea, em que Mob4 não é igualmente expressa em todas as células. O local de integração do gene codificante para a Mob4-Dendra2, inserido no genoma das células de forma aleatória, pode influenciar os níveis de expressão desta proteína, sendo que estes podem ser elevados em algumas células e quase nulos em outras. O que pode explicar a impossibilidade de visualizar a localização de Mob4 em todas as células da população. Apenas uma porção das células RPE-1 Mob4-Dendra2 apresentam marcação específica que é atribuída à proteína Mob4 (figura 26), o que pode ser causado pela expressão variável desta proteína nas células. Assim, em células que expressam níveis elevados de Mob4 é possível observar a proteína, enquanto que células que expressam níveis reduzidos de proteína Mob4, parecem estar a emitir um nível de fluorescência abaixo do detetável, pelo que não é possível visualizar a Mob4.

Estas são as principais diferenças entre as duas populações celulares utilizadas neste estudo e que se traduzem em populações de células com aspetos bastante distintos, quando comparadas visualmente (figura 27).

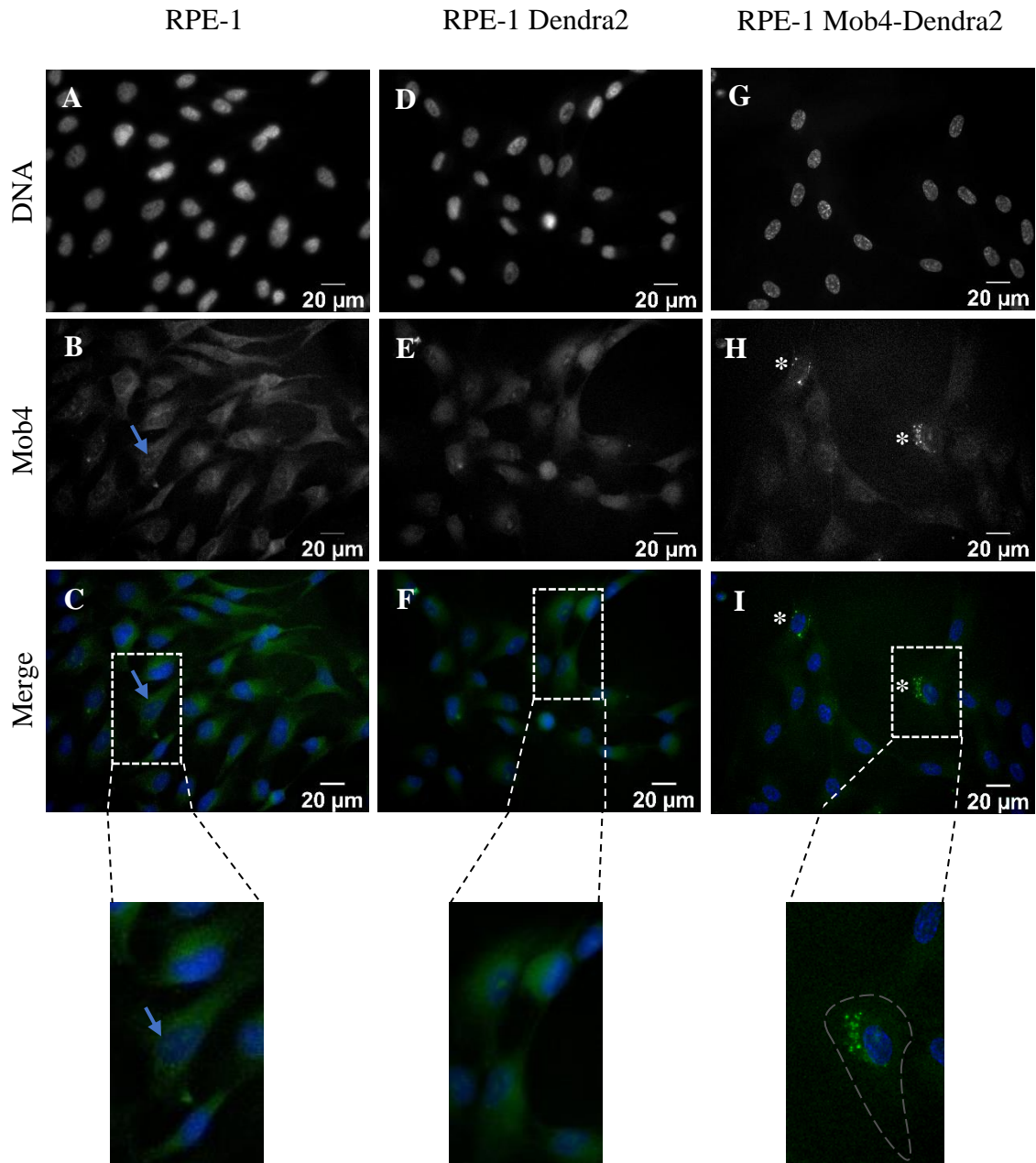


Figura 26-As células RPE-1 Mob4-Dendra2 apresentam marcação específica para a proteína Mob4. (A-C) Células RPE-1, foram usadas como controlo, sendo possível observar a presença de autofluorescência intensa, como por exemplo marcação dos nucléolos (setas azuis). (D-F) Uma população de células RPE-1 Dendra2 foi também utilizada como controlo, de modo a excluir artefactos de fluorescência causados pela Dendra2. (G-I) As células Mob4-Dendra2 exibem marcação citoplasmática, sendo esta atribuída à localização de Mob4 (asteriscos brancos em H e I). As células foram fixadas com metanol:acetona e o DNA corado com DAPI, 0,25 μg/mL. Azul-DNA, verde-Mob4.

Nas células CRAL 30, em células em interfase, a Mob4 aparenta localizar-se num único agregado na zona perinuclear (figura 27 A-B). As células CRAL 30 apresentam uma área citoplasmática relativamente pequena, sendo que o núcleo constitui a maior parte do volume celular. Assim, a agregação de Mob4 apresenta-se na forma de um agregado singular e de pequenas dimensões, junto ao núcleo. Este é visível e idêntico em todas as células e facilmente identificável.

No entanto, nas RPE-1 são visíveis vários agregados distribuídos por todo o citoplasma celular, em células interfásicas (figura 27 C-F). As células RPE-1 são células que possuem uma maior área citoplasmática, quando comparadas a células HeLa, estas apresentam elevada aderência ao substrato e tendem a espalhar-se, adquirindo um formato achatado e formando longas protuberâncias citoplasmáticas. Assim, apesar da fluorescência nestas células não ser tão intensa quando desejável, dificultando a observação de Mob4, e de esta não ser visível em todas as células, é possível verificar que a Mob4 se acumula por todo o citoplasma celular. Esta acumulação demonstra ser variável de célula para célula, podendo manifestar-se em pequenos agregados presentes em grande densidade por todo o citoplasma (figura 27, C), agregados de maior dimensão em elevada densidade ocupando também todo o citoplasma (figura 27, D), agregados restringidos a uma região citoplasmática em particular (figura 27, E) ou agregados de tamanho variável em menor densidade (figura 27, F). O padrão de localização de Mob4 em células RPE-1 é, portanto, bastante diferente em cada célula, podendo talvez ser influenciado pela morfologia da célula em particular e pela área do citoplasma disponível na célula.

Concluindo, a partir dos resultados apresentados nestes subcapítulo é possível verificar que a proteína Mob4 é expressa e visível em ambas as populações de células e aparenta estar localizada quer no citoplasma das CRAL 30, quer no citoplasma das RPE-1 Mob4-Dendra2, **figura 27**. No entanto, os padrões de localização de Mob4 observados são bastante distintos um do outro, o que sugere que Mob4 pode estar associado a organelos citoplasmáticos distintos nestes dois tipos celulares, HeLa e RPE-1, podendo assim estar também a exercer funções distintas nestes tipos celulares.

Sendo que de seguida, iremos discutir a possível co-localização entre a proteína Mob4 e um importante organelo citoplasmático, em ambos os tipos celulares estudados.

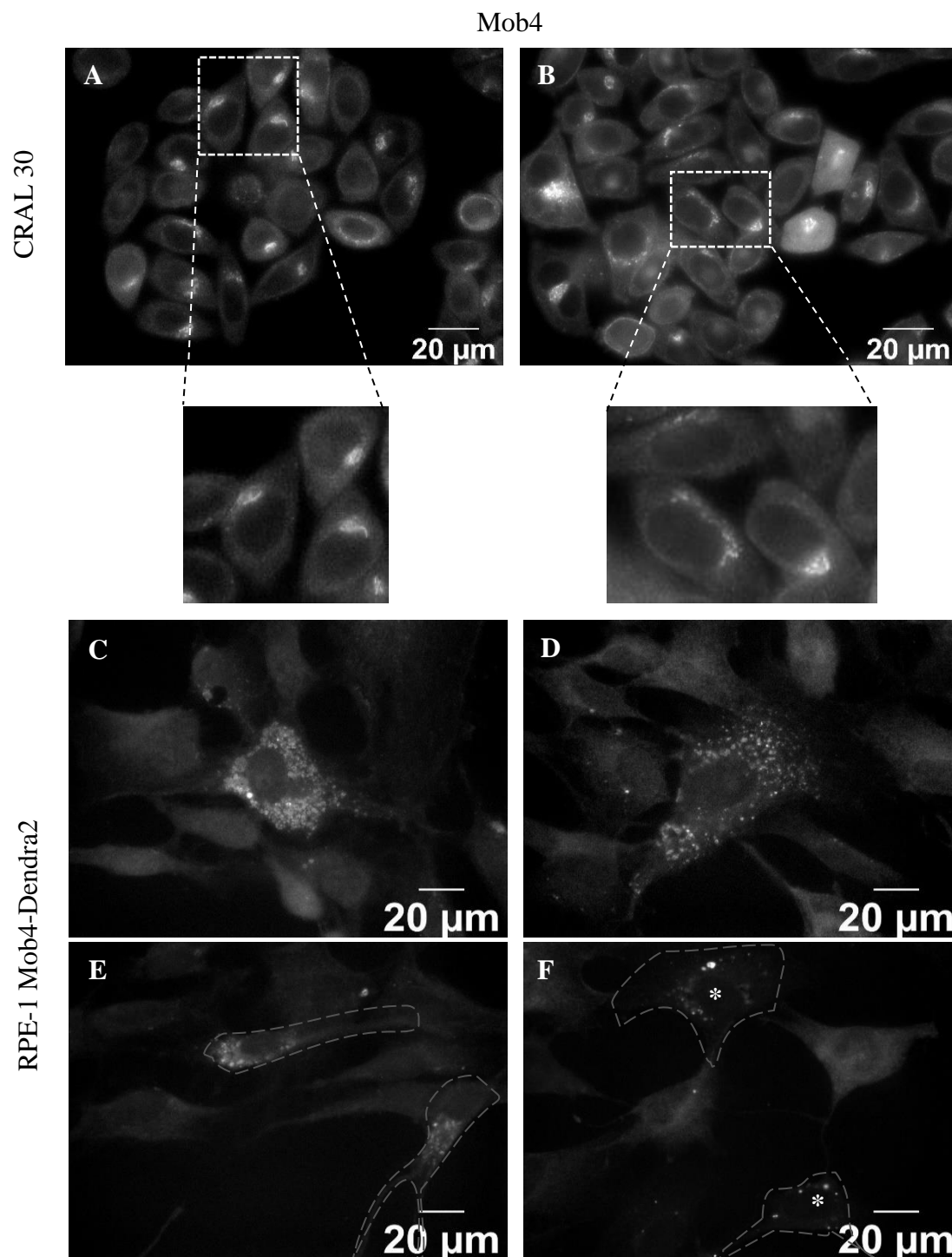


Figura 27-O padrão de localização de Mob4 nas células interfásicas CRAL 30 e nas células interfásicas RPE-1 não é semelhante. (A-B) Dois exemplos de campos microscópicos onde é possível observar a localização de Mob4 em células CRAL 30. A proteína Mob4 está localizada na região perinuclear em todas as células CRAL 30. (C-F) Nas células RPE-1, a proteína Mob4 aparenta estar dispersa pelo citoplasma, apresentando-se em agregados que variam em número, tamanho e densidade. Em C e D é possível observar células com grande densidade de agregados de Mob4, dispersos por todo o citoplasma, enquanto que em E e F o número de agregados é menor, localizando-se apenas numa região restrita do citoplasma (células com asteriscos brancos). As células foram fixadas com metanol:acetona.

7.6 A proteína Mob4 co-localiza com o Golgi em células HeLa, mas não em RPE-1

Uma das estruturas citoplasmáticas com o qual Mob4 poderá estar associada é o organelo membranar Golgi. O Golgi está localizado perinuclearmente nas células e a sua aparência pode variar dependendo do tipo de células observado. De modo a perceber se a Mob4 co-localiza com o Golgi nas duas linhas celulares estudadas, a giantina (proteína localizada no Golgi, sendo comumente utilizada como um marcador deste) foi marcada e visualizada através de imunofluorescência (ensaio realizado como descrito no subcapítulo **6.13**; anticorpos utilizados estão discriminados na **tabela 4**).

A **figura 28** reflete os resultados observados nas células CRAL 30 e nas células RPE-1 Mob4-Dendra2, onde se pode verificar que a Mob4 co-localiza com o Golgi nas primeiras, mas não aparenta co-localização com o Golgi nas segundas. A localização de giantina nas células CRAL 30 é idêntica e parece completamente sobrepor-se à localização de Mob4, em células em interfase (**figura 28 A-C**). O mesmo não pode ser dito nas células RPE-1, já que os padrões de localização apresentados pela giantina e pela Mob4 não são similares e os agregados de Mob4 não aparentam co-localizar e associar-se ao Golgi (**figura 28 D-F**).

Estes resultados apontam para uma associação entre a proteína Mob4 e o Golgi em células HeLa, durante a interfase. No entanto, é de questionar se esta ligação se mantém durante a mitose; os resultados mostrados na **figura 29** indicam que a resposta é não, visto que a Mob4 não parece seguir a dinâmica do Golgi observada durante esta fase da divisão celular. Um olhar mais detalhado ao comportamento do Golgi nas células HeLa e RPE-1 é apresentado na **figura 8** em **anexos**.

O Golgi segue uma dinâmica muito própria durante a mitose (**figura 8, anexos**), no entanto o mesmo não é observado em relação à proteína Mob4, sendo que os dois apresentam comportamentos distintos durante as diversas fases da mitose (**figura 29**). O facto de a Mob4 co-localizar com o Golgi apenas em interfase e não em mitose, sugere que esta proteína pode contribuir para a organização e manutenção estrutural do Golgi mas não para a regulação da dinâmica desta estrutura durante a mitose.

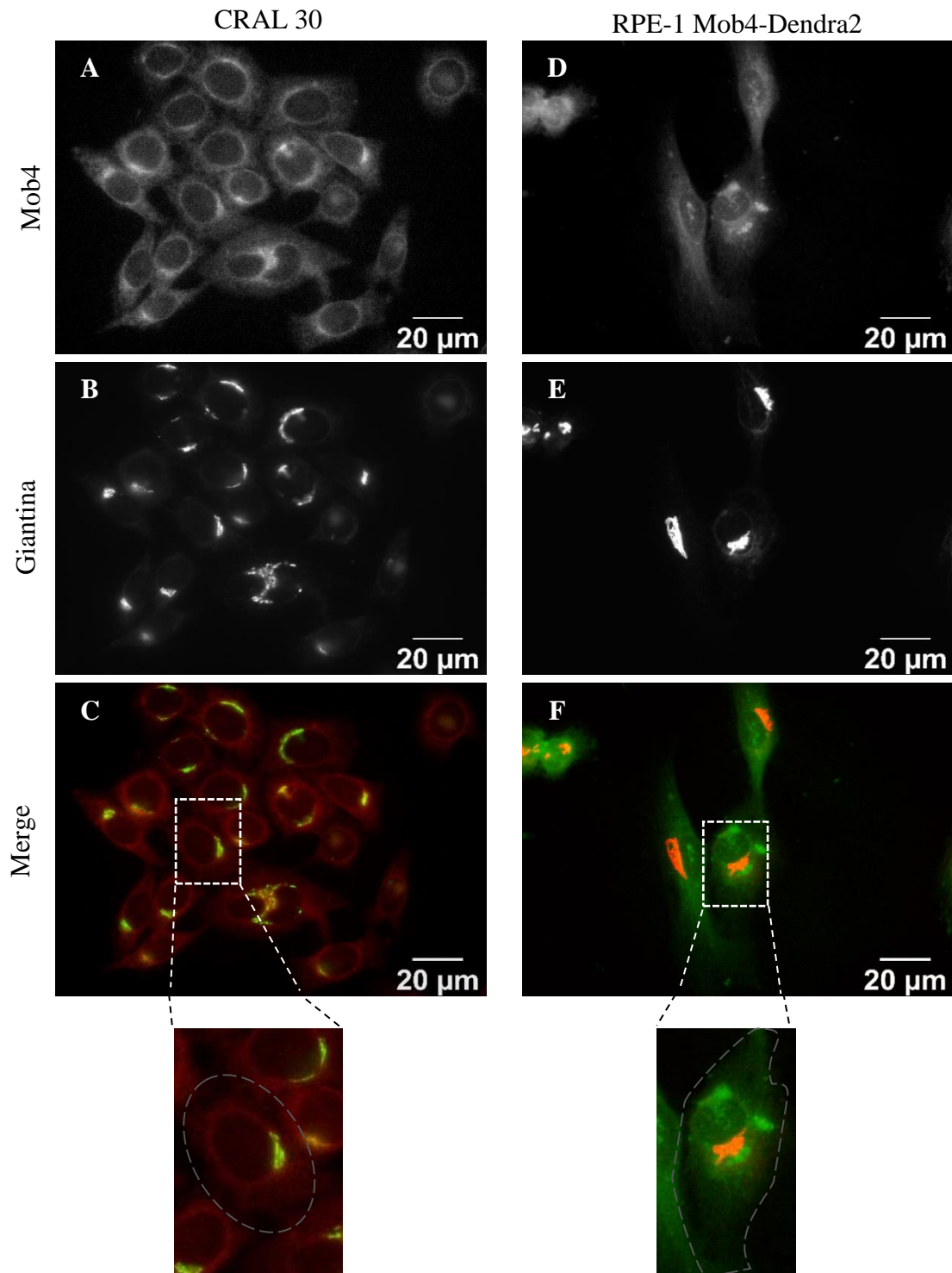


Figura 28-A Mob4 co-localiza com o Golgi em células HeLa, em interfase, mas não nas RPE-1. (A-C) É possível observar sobreposição da localização da Mob4 e da giantina nas células CRAL 30 interfásicas. (D-F) Em células RPE-1 não é possível observar sobreposição da localização de Mob4 e giantina. As células foram fixadas com metanol:acetona e o DNA corado com DAPI, 0,25 μg/mL. A giantina foi visualizada recorrendo a imunofluorescência, utilizando um anticorpo primário anti-giantina, como descrito na tabela 4, subcapítulo 6.13. CRAL 30: vermelho-Mob4, verde-giantina; RPE-1: verde-Mob4, vermelho-giantina.

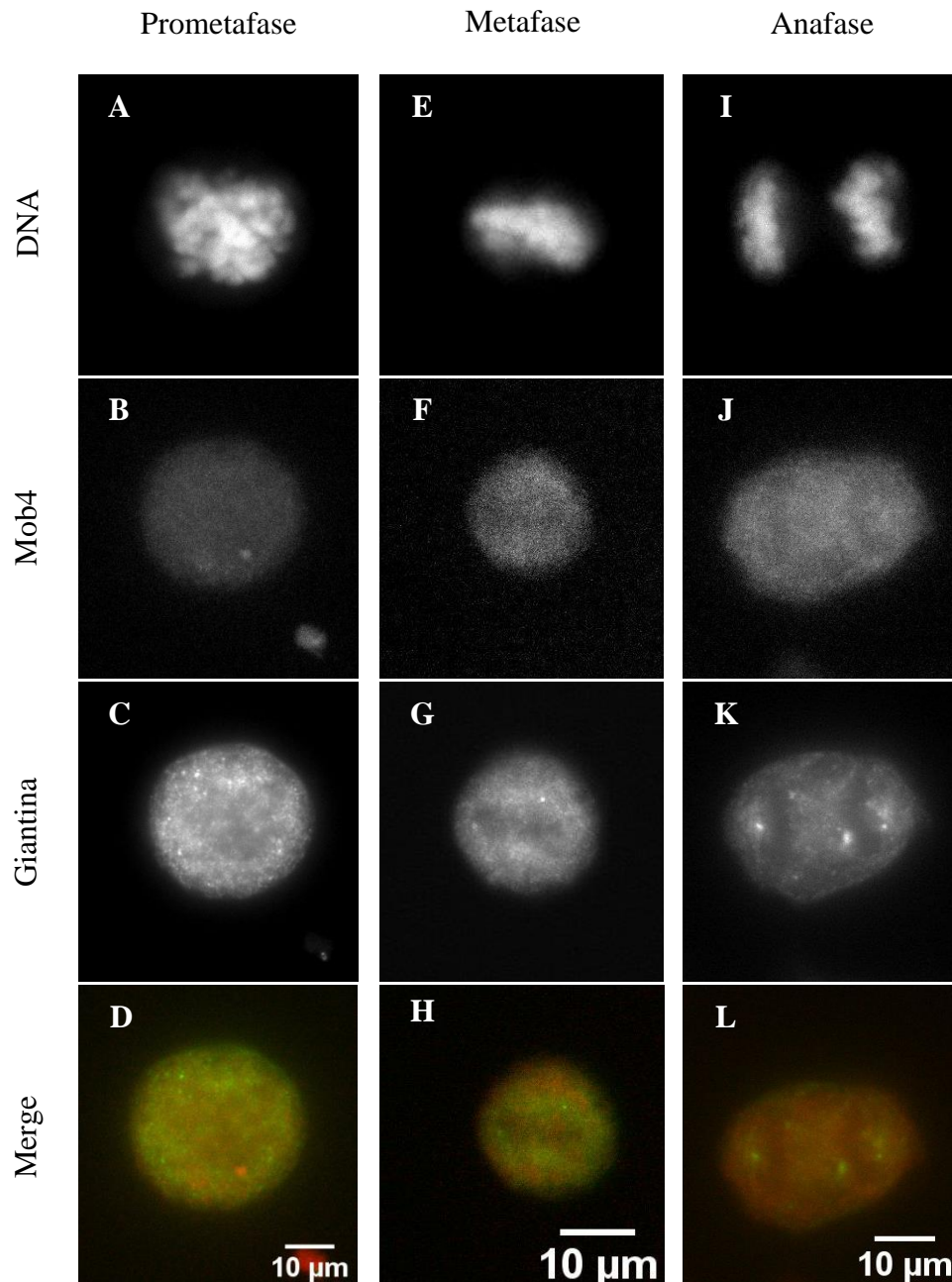


Figura 29-A Mob4 não co-localiza com o Golgi durante mitose, em células HeLa. Apesar de estarem associados, durante interfase, a proteína Mob4 e o Golgi não demonstram o mesmo comportamento durante as fases da mitose, visto que estes não co-localizam em prometáfase (A-D), metáfase (E-H), nem em anáfase (I-L). As células foram fixadas com metanol:acetona e o DNA corado com DAPI, 0,25 μ g/mL. Vermelho-Mob4, verde-giantina.

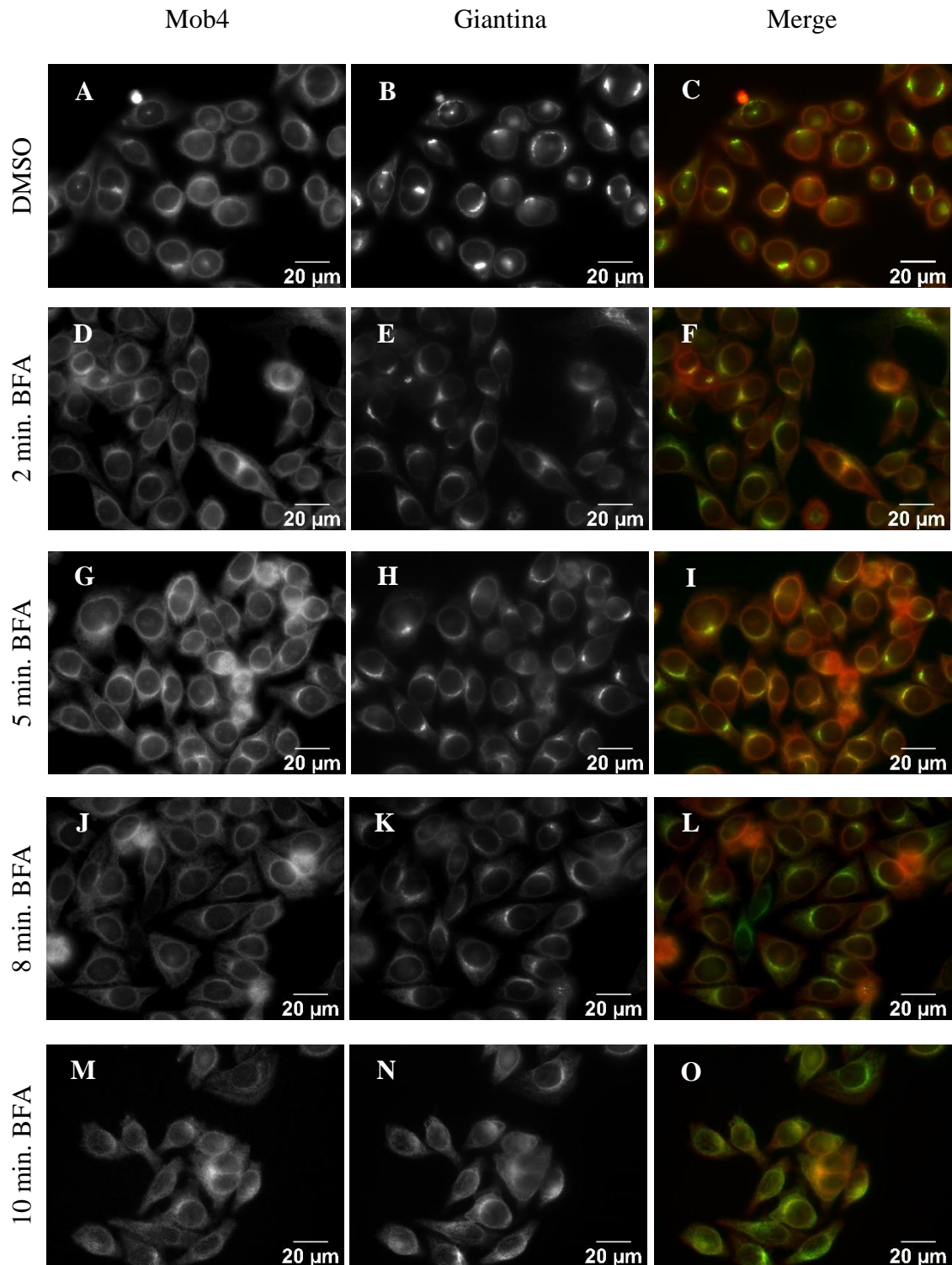
7.7 A *Brefeldin A* causa dispersão de Mob4, em células HeLa

Muitos do complexos e proteínas associados ao Golgi são sensíveis à *Brefeldin A*; esta droga impede a formação e transporte de vesículas do retículo endoplasmático para o Golgi, o que resulta no colapso desta estrutura. Desta forma a *Brefeldin A* afeta a associação da maioria das proteínas envolvidas no transporte vesicular ao Golgi. Com o objetivo de compreender se esta droga afeta a ligação da Mob4 ao complexo de Golgi, células CRAL 30 foram tratadas com *Brefeldin A*.

De forma a otimizar as condições adequadas de tratamento com *Brefeldin A* a utilizar, células foram tratadas durante 2, 5, 8 ou 10 minutos (experiência descrita no subcapítulo **6.14**), para perceber qual destas condições causa o efeito de fragmentação do Golgi mais intenso. Foi observado que apenas uma parte das células que sofreram tratamento com *Brefeldin A* por 2 e 5 minutos foram afetadas pela droga e que a fragmentação do Golgi, nas células afetadas, foi parcial e não total (figura 30 D-I). Os 8 e 10 minutos de tratamento mostraram ser as condições em que esta droga afeta o Golgi mais intensamente, provocando um colapso mais extenso deste organelo e afetando também um maior número de células tratadas (figura 30 J-O). No entanto, um tratamento mais prolongado pode não ser o ideal pois as células tendem a recuperar dos efeitos desta droga e re-compactação do Golgi pode ser observada, fenómeno que começa a ser visível após 10 minutos de tratamento. Células não tratadas com *Brefeldin A* foram utilizadas como controlo nesta experiência (foi apenas adicionado DMSO, solvente no qual a *Brefeldin A* se encontra diluída).

Ainda assim, quer nas células tratadas com *Brefeldin A* por 8, quer nas tratadas por 10 minutos é possível verificar que ocorre a dispersão da proteína Mob4 pelo citoplasma das células. A típica marcação de Mob4, na região perinuclear da célula é perdida e pequenos agregados espalhados por todo o citoplasma são observados, como é exemplificado na **figura 30** (painéis J e M, células identificadas com asteriscos brancos).

Estes resultados demonstram que a associação da proteína Mob4 ao Golgi é afetada pela *Brefeldin A*, o que sugere que Mob4 poderá contribuir para a manutenção e organização estrutural desde organelo. Estes resultados são também semelhantes aos resultados obtidos e publicados num outro estudo relativo à proteína Mob4, por ³¹*Baillat et al*, em 2001 e que vou discutir em mais detalhe no capítulo seguinte.

A

A'

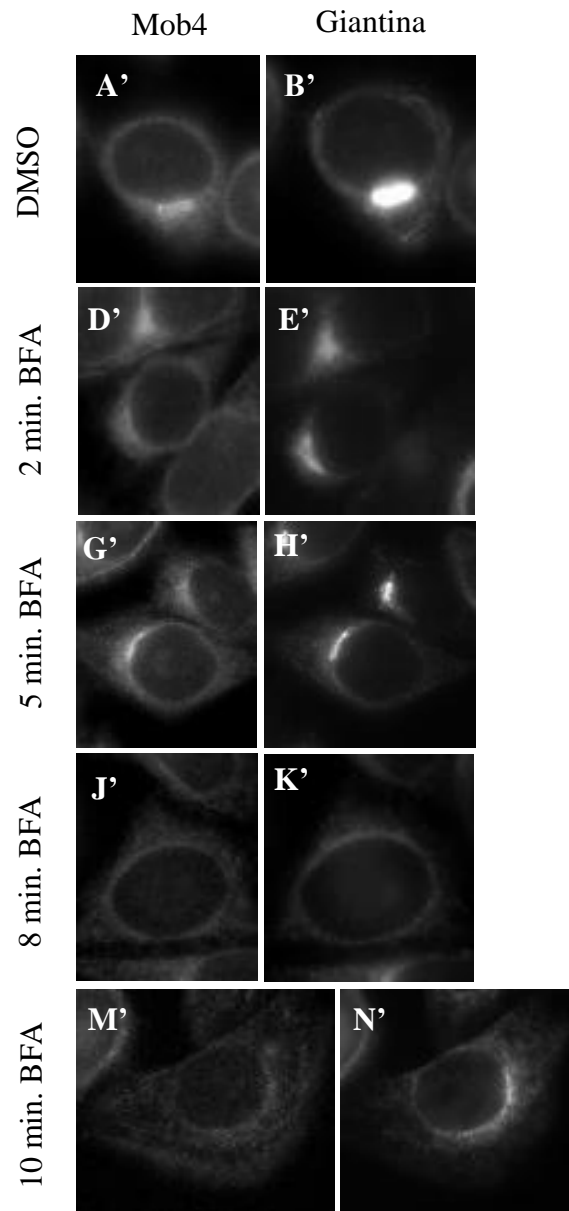


Figura 30- A *Brefeldin A* causa dispersão da Mob4, em células HeLa. Células CRAL 30 foram tratadas com 0,5 µg/mL de *Brefeldin A* por 2 (D-F), 5 (G-I), 8 (J-L) e 10 minutos (M-O). Tratamento durante 2 e 5 minutos mostrou ser insuficiente para o colapso do Golgi, enquanto que tratamento durante 8 e 10 minutos mostraram fragmentação total do Golgi com grande percentagem das células tratadas afetada. É possível observar que a proteína Mob4 se encontra dispersa pelo citoplasma celular (J e M, células com asteriscos brancos), em células tratadas com *Brefeldin A* por 8 ou 10 minutos. **Painel A'** refere-se às ampliações, de uma célula só, das imagens do **Painel A**, referentes à Mob4 e à giantina DMSO refere-se às células controlo, não tratadas com a *Brefeldin A*. As células foram fixadas com metanol:acetona e o DNA corado com DAPI, 0,25 µg/mL. Vermelho-Mob4, verde-giantina.

7.8 A proteína Mob4 associa-se a filamentos do citoesqueleto em células RPE-1, mas não em HeLa

Fora os agregados citoplasmáticos, a proteína Mob4 aparenta organizar-se em estruturas tipo filamentos em células RPE-1, em interfase. Estas estruturas são amplamente visíveis em células de maior tamanho e cuja morfologia permite uma maior área citoplasmática, onde a célula estabelece um elevado contacto com o substrato. No entanto, esta observação não é restrita a tais células, sendo também observada em células de menores dimensões, apesar de com menor nitidez, como é exemplificado na **figura 31**. Perante este resultado, é possível que a Mob4 se associe a filamentos do citoesqueleto em células RPE-1, podendo contribuir para a manutenção estrutural celular ou para a mobilidade celular, visto que células RPE-1 são células notavelmente móveis, comparando, por exemplo às células HeLa. A função da Mob4 nestas estruturas vai, com certeza, depender do tipo de filamentos a que esta estará associada (filamentos de actina ou microtúbulos).

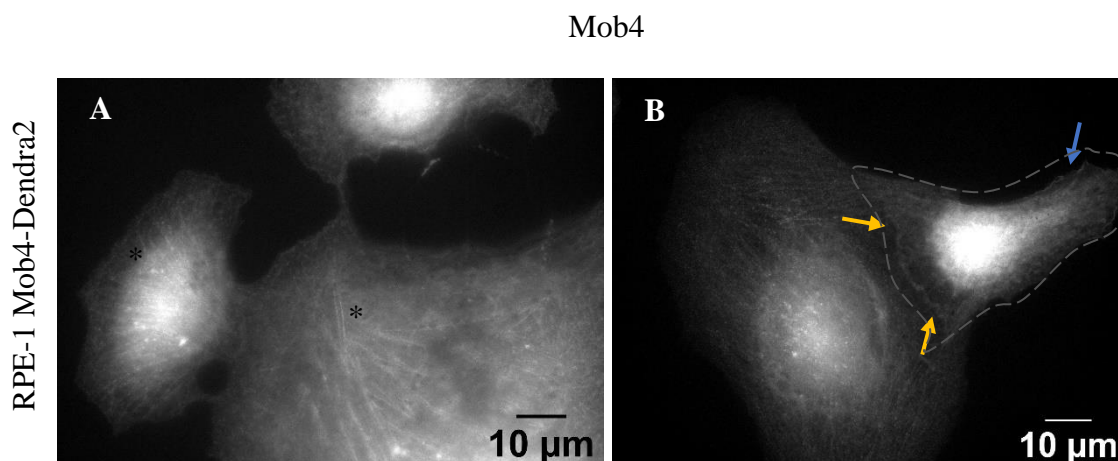


Figura 31-A Mob4 associa-se a filamentos do citoesqueleto e acumula-se nos pontos de aderência celular, em células RPE-1. A proteína Mob4 organiza-se em estruturas tipo filamentos (asteriscos), sugerindo a sua associação a filamentos do citoesqueleto, e acumula-se nos focos de adesão celular ao substrato (seta azul) e nos pontos de contacto célula-célula (setas amarelas). As células foram fixadas com metanol:acetona e o DNA corado com DAPI, 0,25 µg/mL.

É também possível visualizar a acumulação de Mob4 nos pontos de aderência celular ao substrato nestas células (figura 31, painel B, seta azul) e nos pontos de contacto célula-célula (figura 31, painel B, setas amarelas). As zonas de aderência celular são extremamente ricas em fibras de actina, pelo que existe uma forte possibilidade de que a Mob4 esteja associada aos filamentos de actina. Resultados obtidos, em paralelo, no

laboratório, pela Inês Baião, indicam que a Mob4 estabelece ligação às fibras de actina em células HCT116, formando estruturas semelhantes às observadas na **figura 31** nas células RPE-1. Todos estes resultados mencionados reforçam a hipótese de que a Mob4 está associada a filamentos de actina em células RPE-1.

Ainda que não seja observável a formação de estruturas tipo filamentos pela proteína Mob4 em células HeLa, é visível a sua acumulação nos pontos de aderência celular. Assim, de forma idêntica às células RPE-1, Mob4 está presente nas zonas de aderência das células HeLa ao substrato (figura 32, setas azuis). Sugerindo que poderá existir algum grau de associação entre a Mob4 e a actina, também nestas células e que esta proteína poderá participar no processo de mobilidade celular em células HeLa. É de considerar, como mencionado acima, que estas células não apresentam o mesmo nível de mobilidade celular que as células RPE-1, nem adquirem uma morfologia com grande área citoplasmática, razões pelas quais, talvez, não seja possível visualizar a localização de Mob4 nos filamentos do citoesqueleto.

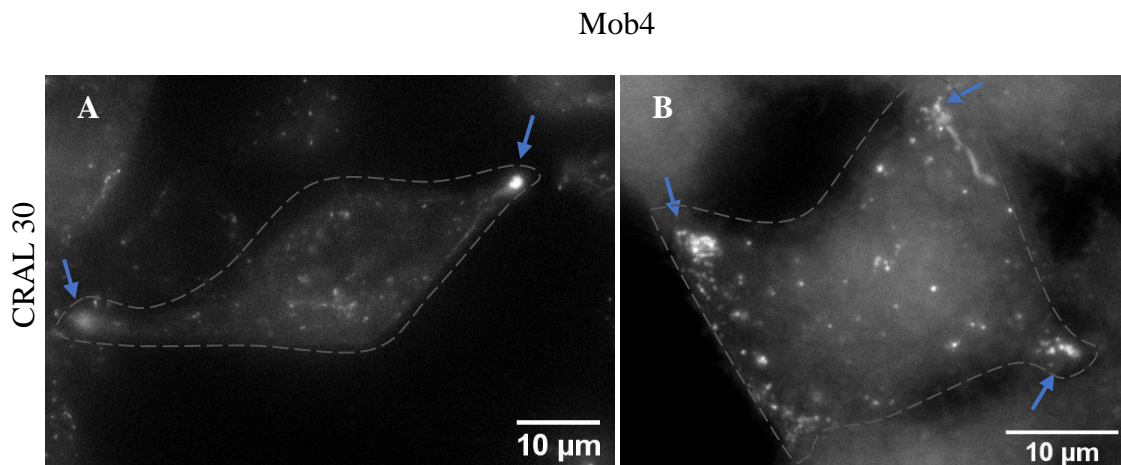


Figura 32-A Mob4 acumula-se nos pontos de aderência celular, em células HeLa. De forma semelhante às RPE-1, o estudo da localização da proteína Mob4 nas células CRAL30 revelou que esta está localizada nas zonas de aderência das células ao substrato, em pontos celulares bem definidos (setas azuis). As células foram fixadas com metanol:acetona e o DNA corado com DAPI, 0,25 µg/mL.

7.9 A proteína Mob4 está localizada nos polos do fuso mitótico durante a mitose

Vista a distribuição da localização da Mob4 em células HeLa e RPE-1 durante a interfase, é agora importante perceber onde esta proteína está localizada durante a mitose e a partir de tais resultado inferir potenciais funções da Mob4 em mitose.

Em ambas as linhas celulares estudadas, a Mob4 aparenta estar localizada nos dois polos opostos do fuso mitótico das células metafásicas (figura 33).

Em células HeLa, é possível observar a acumulação de Mob4 nos polos do fuso mitótico em todas as células metafásicas observadas (figura 33, painel B, asteriscos brancos). Para além de células que apresentavam fusos bipolares, onde a Mob4 aparenta estar localizada nos dois polos (figura 33, painel C''), foi também possível visualizar células com fusos monopolares (figura 33, painel B, asterisco azul). Nestas células, a proteína Mob4 aparentava estar acumulada no único polo existente, como é possível observar na **figura 33, painel C'**.

Já nas células RPE-1 esta marcação é vista apenas numa pequena percentagem de células em metafase, cerca de 4-5%. Na tentativa de descartar artefactos devido ao método de fixação, foram testados dois métodos de fixação nestas células, nomeadamente fixação com metanol:acetona e fixação com 3,7% de formaldeído (como descrito no subcapítulo **6.11**). As células foram também observadas por microscopia em tempo real, no entanto a percentagem de células em metafase cuja localização de Mob4 era visível permaneceu inalterada. Concluindo-se assim que este fenómeno não é um artefacto da fixação das células e que a marcação da proteína não é perdida devido a tal. A hipótese mais provável para explicar a baixa percentagem observada de células RPE-1 com localização de Mob4 nos polos do fuso é o sistema utilizado para a criação desta população de células. Tal como discutido anteriormente no subcapítulo **7.5**, esta população celular é heterogénea e cada célula expressa diferentes níveis da proteína Mob4, podendo muitos destes estar abaixo do nível de deteção de fluorescência.

Como pode ser visto na **figura 33**, a localização de Mob4 não é exatamente idêntica nas duas linhas celulares. Enquanto que nas células HeLa é observada uma acumulação dispersa nos polos, nas células RPE-1 são visíveis dois pontos bem nítidos, um em cada polo do fuso mitótico, sendo que esta marcação é semelhante à de centrossomas.

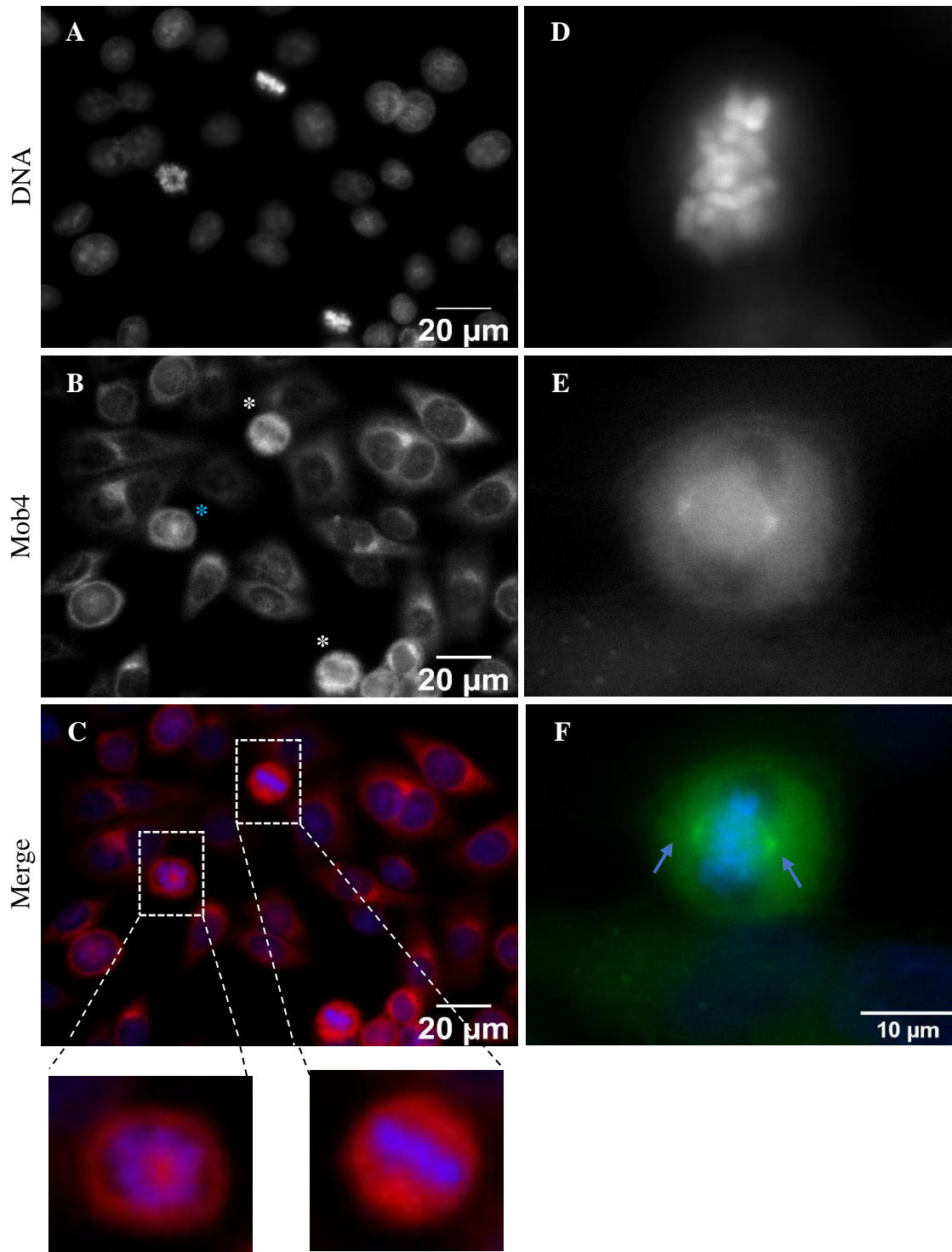


Figura 33-A Mob4 está localizada nos polos do fuso mitótico em células metafásicas. (A-C) Em células HeLa, a Mob4 acumula-se nos dois polos do fuso mitótico (asteriscos brancos e painel C’). Raras são as células monopolares observadas, no entanto, nessas a Mob4 parece ser também expressa no único polo existente (asterisco azul e painel C’). (D-F) Em células RPE-1, a proteína parece estar a ser expressa em dois pontos bem definidos dos polos (setas azuis), assemelhando-se a centrossomas. As células foram fixadas com metanol:acetona e o DNA corado com DAPI, 0,25 μg/mL. CRAL 30: azul-DNA, vermelho-Mob4. RPE-1: azul-DNA, verde-Mob4.

7.10 Depleção de Mob4 causa defeitos no alinhamento dos cromossomas e na formação do fuso mitótico

Para além dos resultados mostrados no subcapítulo anterior, a localização de Mob4 em células mitóticas é dificilmente vista e não está claro, apenas com o estudo da sua localização, qual a função que esta proteína pode estar a desempenhar durante a mitose nestas células. Consequentemente, foi realizada a depleção de Mob4 em ambos os tipos celulares, por iRNA, na expectativa de que a caracterização dos efeitos causados pela supressão da expressão desta proteína desse indicação da sua potencial função na mitose.

Apesar desta experiência ter sido realizada nas células HeLa e nas células RPE-1, neste subcapítulo vão ter maior foco os resultados obtidos nas células RPE-1, já que os defeitos observados em HeLa foram já maioritariamente caracterizados anteriormente no laboratório.

A depleção de Mob4 foi realizada de acordo com o descrito no subcapítulo **6.15**, sendo as células foram transfetadas e re-transfetadas dois dias depois. A preparação de extratos proteicos e fixação e observação das células ocorreram ao dia 2 e ao dia 4 após a primeira transfecção. Este protocolo utilizado é baseado no protocolo otimizado para células HeLa, mas que não está ainda otimizado para células RPE-1.

Foi visto que a re-transfecção das células com oligo provoca elevada morte celular nas células RPE-1, impossibilitando uma análise detalhada dos defeitos mitóticos nas células recolhidas ao dia 4 após transfecção. Assim, o reduzido número de células e o reduzido índice mitótico nestas células não permitiu a contabilização e caracterização dos efeitos específicos na mitose causados pela depleção de Mob4. De modo geral, estas células apresentavam-se muito pouco saudáveis, com elevada morte celular e sem células mitóticas aparentes. Estes fenómenos parecem ser uma consequência da depleção da proteína, sugerindo assim que a Mob4 poderá ser necessária para a mitose, sendo que sem esta proteína as células poderão ficar retidas em mitose e, eventualmente, morrer. Fenótipo este, que foi já caracterizado em células HeLa, aquando a depleção de Mob4. No entanto, é necessário, no futuro, otimizar o protocolo de iRNA utilizado para a realização da depleção de Mob4, em células RPE-1, em particular, de modo a melhor perceber o mecanismo por detrás dos eventos aqui mencionados.

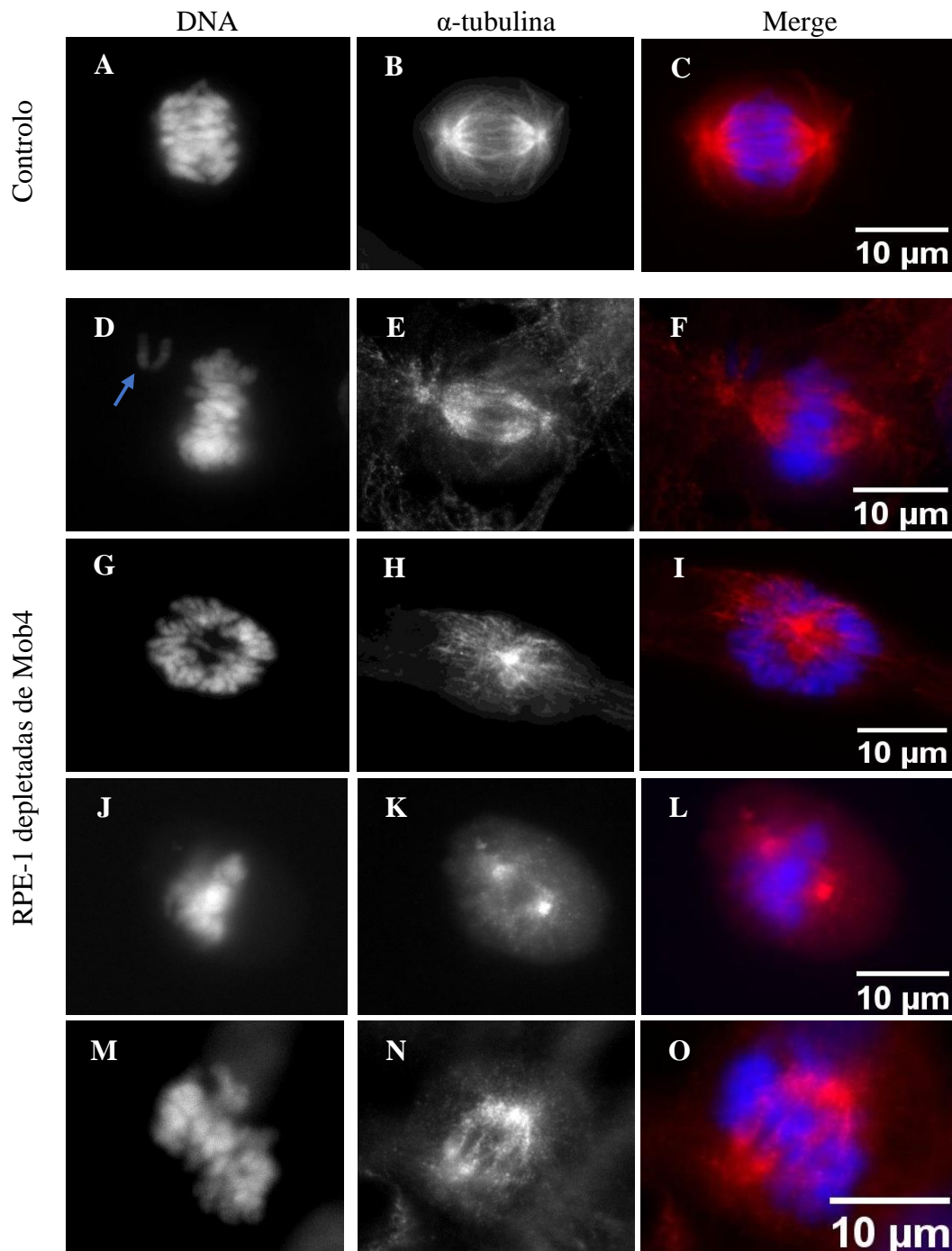


Figura 34- A depleção de Mob4 causa defeitos mitóticos em células RPE-1. (A-C) Célula mitótica controlo, transfetada com oligo *scramble*. (D-O) Células RPE-1 que sofreram depleção de Mob4 apresentam vários defeitos mitóticos, tais como o não alinhamento dos cromossomas mitóticos (D-F, seta azul), e defeitos na formação do fuso mitótico, entre os quais fusos monopolares (G-I), fusos malformados (J-L) e fusos não focados (M-O). As células foram fixadas com metanol:acetona e o DNA corado com DAPI, 0,25 μ g/mL. Azul-DNA, vermelho- α -tubulina.

As células RPE-1 observadas no dia 2, que receberam apenas uma transfecção com oligo, aparentavam estar, no geral, saudáveis. Não foi observada uma elevada taxa de morte

celular, apesar de o índice mitótico nestas células ser também mais reduzido, quando comparado com os controlos (células não transfetadas e células transfetadas com oligo *scramble*). De tal modo, foi possível observar e contabilizar os defeitos mitóticos causados pela depleção da Mob4 nestas células.

Na **figura 34** estão então exemplificados alguns dos efeitos mais comuns observados pela depleção de Mob4 nas células RPE-1, sendo estes, defeitos no alinhamento dos cromossomas mitóticos e defeitos na formação do fuso mitótico. Cerca 29-30% das células RPE-1 mitóticas depletadas de Mob4 apresentavam defeitos, comparando com 6-7% em células transfetadas com oligo *scramble* e apenas 1-2% em células RPE-1 não transfetadas para iRNA. Como mencionado acima, estes defeitos ocorrem principalmente no alinhamento dos cromossomas mitóticos (figura 34, D-F) e no fuso mitótico, sendo que estes últimos incluem fusos monopolares (figura 3, G-I), fusos malformados (figura 34, J-L), fusos com os microtúbulos não focados (figura 34, M-O) (a partir do centrosoma; quer de apenas um dos polos, quer de ambos os polos) e fusos não centrados em relação ao plano celular.

Já em células HeLa, os defeitos mais comuns observados são o incorreto alinhamento dos cromossomas mitóticos na placa metafásica e células multinucleadas. Quer os defeitos observados em células RPE-1, quer os observados em células HeLa são semelhantes aos defeitos caracterizados anteriormente no laboratório (em células HeLa, apenas), o que, por um lado, confirma resultados previamente obtidos e, por outro lado, nos sugere que Mob4 pode desempenhar funções idênticas em HeLa e RPE-1 durante a mitose. Tais como a promoção da correta ligação cinetocoros-microtúbulos, que possibilita o correto alinhamento dos cromossomas, sendo que Mob4 aparenta ser uma proteína essencial para conclusão da mitose em ambos os tipos celulares estudados.

Apesar dos defeitos observados, a análise de extratos proteicos das células não permitiu concluir se, de facto, ocorreu depleção significativa de Mob4 (figura 35). Sendo que a ausência de proteína detetada por Western Blot pode dever-se à reduzida quantidade de extrato proteico preparado, e não à ausência de expressão da Mob4 nas células. No entanto, a significativa redução de fluorescência associada à marcação de Mob4 observada nestas células quando comparando às células controlo sugere que terá existido depleção da proteína Mob4, a certo nível.

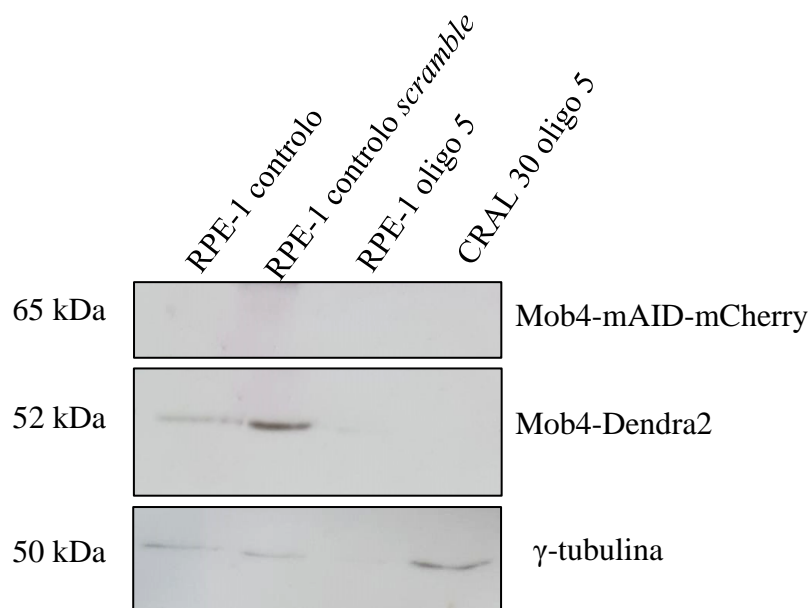


Figura 35-Análise de iRNA de Mob4 por Western Blot. Não foi detetada proteína Mob4 em células que sofreram iRNA, no entanto a ausência da proteína pode dever-se à quantidade reduzida de extrato proteico, fazendo assim com que os níveis de proteína estejam abaixo dos níveis de deteção. Já as células HeLa parecem ter sofrido depleção da proteína, como era desejado. RPE-1 controlo refere-se ao resultado obtido com o extrato proteico de células RPE-1 Mob4-Dendra2 não transfetadas com oligo. RPE-1 controlo *scramble* refere-se ao resultado obtido com o extrato proteico de células RPE-1 Mob4-Dendra2 transfetadas com oligo *scramble*. A expressão da proteína foi determinada por Western Blot; foram utilizados os anticorpos primários 16E2 (anti-Mob4) e GTU-88 (anti- γ -tubulina).

7.11 A proteína Mob4 tem uma expressão regulada ao longo do ciclo celular?

Levando em conta o tipo de erros observados nas células depletadas de Mob4, que sugerem que esta proteína é necessária para a realização da mitose, coloca-se a hipótese se a Mob4 poderá ser uma proteína regulada pelo ciclo celular. De forma a caracterizar a expressão de Mob4 durante o ciclo celular, células HeLa foram sincronizadas, através de um duplo bloqueio de timidina (descrito no subcapítulo 6.16). Foram também bloqueadas células em mitose. Células não sincronizadas foram utilizadas como controlo nesta experiência. Sendo o objetivo compreender o comportamento desta proteína, através da sua quantificação ao longo de todas as fases da divisão celular. Pretendia-se verificar se a expressão de Mob4 variava (aumentava ou diminuía) ou se mantinha constante durante os diversos momentos de divisão celular e, em específico, durante a mitose. Resultados

obtidos, em paralelo, no laboratório, sugeriram que a Mob4 poderá apresentar uma expressão cíclica durante o ciclo celular, de forma semelhante às ciclinas, que como já foi discutido são proteínas altamente reguladas durante o ciclo celular.

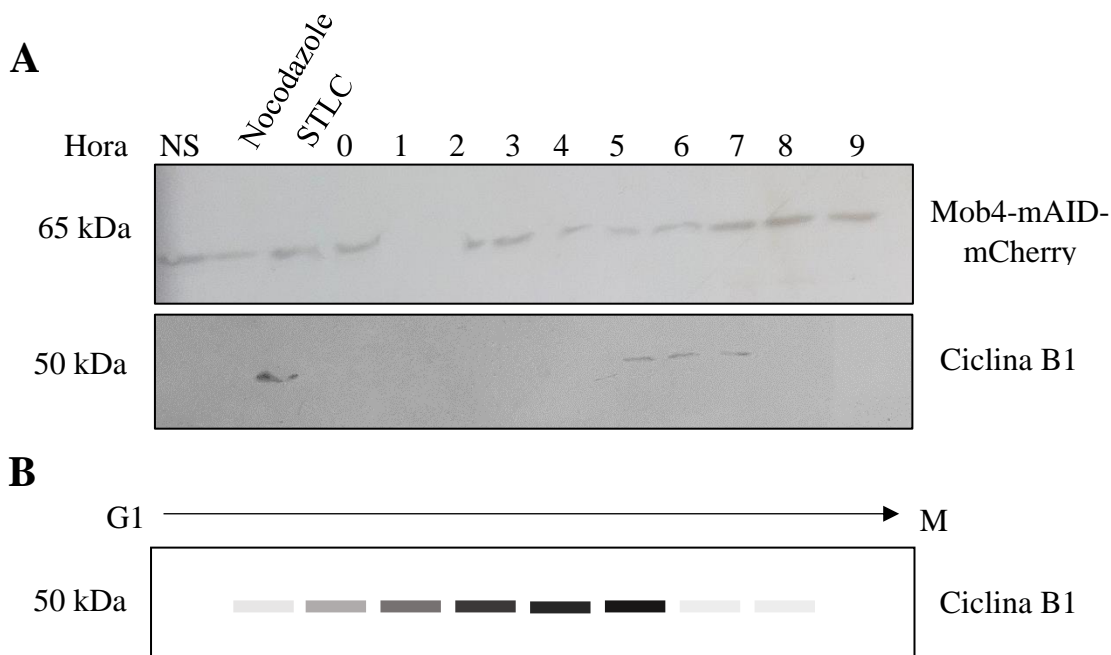


Figura 36-Análise do padrão de expressão de Mob4 ao longo do ciclo celular. (A) A expressão de Mob4 não parece variar durante a interfase, no entanto não é possível, a partir destes resultados, perceber se as células foram sincronizadas, visto que não é possível visualizar a proteína ciclina B1. (B) Esquema representativo do padrão de expressão esperado da ciclina B1 ao longo do ciclo celular (de fase G1 a mitose). Nota: O número de horas é referente às horas após libertação de timidina; não foi possível obter resultados entre as 10-20 horas após libertação de timidina; NS refere-se a células não sincronizadas (utilizadas como controlo nesta experiência). A expressão da proteína foi determinada por Western Blot; foram utilizados os anticorpos primários 16E2 (anti-Mob4) e anti-ciclina B1.

Como é possível verificar pela **figura 36**, os resultados obtidos não permitem compreender se a sincronização celular ocorreu. Conseguir determinar o padrão de expressão da ciclina B era fundamental para apurar se as células estavam sincronizadas, pois a sua expressão nas várias etapas do ciclo celular está bem descrita, sendo que a sua expressão aumenta durante interfase e depois diminui abruptamente em mitose. Este seria o padrão de expressão esperado de se observar de modo a poder concluir que as células estavam sincronizadas. No entanto, tal não foi obtido, portanto e de acordo com os

resultados apresentados, apesar da expressão de Mob4 não parecer variar durante interfase, não é possível afirmar com certeza de que esse é de facto o seu comportamento biológico. Assim, não é possível retirar conclusões sobre o comportamento da expressão da Mob4 durante o ciclo celular.

Esta experiência apresenta resultados ainda preliminares, sendo inconclusivo se a correta sincronização celular foi obtida e de que maneira se comporta a proteína Mob4 ao longo da divisão celular nestas células.

Apresentados todos os resultados, é necessário agora enquadrá-los e contextualizá-los com o que já é sabido sobre esta proteína Mob4, de modo a compreender o papel desta nos diversos processos biológicos aqui discutidos e, principalmente, em mitose. No capítulo seguinte discutiremos estes resultados obtidos e de que forma estes contribuem para o conhecimento desta proteína e do ciclo celular.

8.DISSCUSSÃO

A proteína Mob4 está ainda escassamente estudada, especialmente em humanos. Esta proteína está inserida num complexo proteico, o complexo STRIPAK.^{21-27, 35-39} O STRIPAK está envolvido na regulação de várias vias e processos biológicos essenciais³⁵⁻³⁹ (ver subcapítulo 3.4), 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). Este trabalho tem como objetivo confirmar e clarificar a função da Mob4 nestes processos, recorrendo a células humanas como modelo de estudo.

Foram utilizados dois tipos celulares distintos, células HeLa e células hTERT RPE-1. As células HeLa são células tumorais, enquanto que as células RPE-1 são uma linha primária não tumoral imortalizada, através da expressão da transcriptase reversa da telomerase humana.^{87, 88} A utilização de várias linhas celulares, incluindo linhas não tumorais, é de importância para a confirmação e obtenção de resultados fidedignos, aplicáveis à biologia humana, a nível molecular, visto que as diferenças entre linhas celulares e tecidos podem influenciar as conclusões retiradas destes estudos. Nomeadamente, aquando a utilização de células tumorais, que sofreram transformações a vários níveis, podendo apresentar alterações na regulação de diversos processos celulares, tais como a mitose. Assim, a inclusão da análise de células não tumorais é imperativa para o presente estudo.

Foram construídas duas ferramentas que possibilitaram a visualização e caracterização da localização intracelular da Mob4 nas duas linhas celulares mencionadas. Uma linha celular clonal monoalélica que apresenta a inserção do repórter mCherry no final do gene Mob4, em células HeLa, e que nomeei CRAL 30 (figura 22). Esta representa uma linha celular clonal, onde as células expressam apenas a proteína Mob4 endógena, constituindo, assim uma população de células homogénea onde todas as células expressam a Mob4 na mesma quantidade e com igual relativa intensidade (figura 25). E uma população de células RPE-1 que expressa a proteína de fusão Mob4-Dendra2 (figura 24). Esta população celular é proveniente de uma transfecção estável, sendo uma população não clonal e heterogénea, onde as células estão a sobre-expressar diferentes níveis da proteína

Mob4, apresentando-se com diferentes relativas intensidades de fluorescência (figura 26). Todas as experiências executadas neste estudo no sentido de caracterizar esta proteína foram realizadas recorrendo a estas duas ferramentas.

De acordo com os estudos de localização realizados, a Mob4 apresenta-se como sendo uma proteína citoplasmática, cuja localização é visível em agregados no citoplasma celular, em ambas as linhas celulares, HeLa e RPE-1 (figura 27). No entanto o seu padrão de localização é bastante distinto e diferente nas duas linhas celulares. Nas células HeLa, em interfase, a Mob4 localiza-se num único agregado perinuclear de dimensões relativamente pequenas e semelhantes em todas as células observadas (figura 27, A e B). Estes resultados são idênticos a resultados previamente obtidos no laboratório neste mesmo tipo celular, **figura 12** (Cláudia Florindo, dados não publicados), sendo que este padrão de localização se assemelha também aos padrões de localização visualizados para organelos membranares localizados na região perinuclear, tais como o Golgi^{31, 68, 69} e o retículo endoplasmático^{70, 71}. Desta forma, colocou-se a hipótese de que esta proteína poderia co-localizar com um destes organelos, sendo averiguada a potencial associação da proteína Mob4 com o organelo Golgi. Foi observado que a Mob4 apresenta uma localização que se sobrepõem à localização do Golgi, quer isto dizer que a proteína Mob4 co-localiza com o Golgi (figura 28, A-C), comprovando assim a hipótese colocada. No entanto, a associação entre a Mob4 e o Golgi é apenas visualizada durante a interfase e não durante a mitose nas células HeLa (figura 29). O Golgi segue uma dinâmica muito própria durante a mitose, de modo a assegurar a sua transmissão para ambas as células-filha (figuras 8 e 9, em anexos).^{69, 88-91} Durante a fase G1, o Golgi na sua forma compacta e o centrossoma estão altamente associados um ao outro e proximamente localizados, no entanto na fase S estes começam a distanciar-se, tornando-se completamente independentes na fase G2.⁹⁰ Esta separação permite a migração dos centrossomas para os polos do fuso mitótico, e já em prófase, o Golgi fragmenta-se e os seus componentes dispersam-se envolta do núcleo celular. De forma mediada pelos microtúbulos, os componentes do Golgi migram também para os polos do fuso onde se voltam a associar aos centrossomas, compactando-se ao redor destes. Deste modo, a dinâmica centrossomas-Golgi assegura, durante a anafase, a repartição dos componentes do Golgi pelas duas células-filha. Aquando a saída de mitose, o Golgi é remontado, voltando à sua forma compacta e permanecendo em associação com o centrossoma.⁹⁰ A participação do complexo STRIPAK na regulação desta dinâmica entre o Golgi e o centrossoma tem sido

amplamente especulada^{21, 40}, mas pouco estudada, não sendo ainda comprovado se, de facto, o STIPAK está envolvido neste processo. No entanto, se esse for o caso, a proteína Mob4 não aparenta desempenhar um papel em particular na regulação da associação do Golgi com o centróssoma, visto não acompanhar a localização dinâmica dos componentes do Golgi durante a mitose. Melhor estudado está o papel do STRIPAK na regulação na fragmentação e remontagem do Golgi, sendo que a família de quinases GCKIII é necessária para a correta remontagem e manutenção estrutural deste organelo.^{21, 26, 38} Se a Mob4 está também envolvida na manutenção estrutural do Golgi não é ainda conhecido, no entanto a sua associação com o Golgi apenas em interfase diz-nos que esta proteína poderá estar a contribuir para a sua manutenção. Para elucidar qual poderá ser o papel que a Mob4 está a desempenhar no Golgi, células foram tratadas com *Brefeldin A*. Esta droga provoca a fragmentação do Golgi ao inibir o transporte de vesículas do retículo endoplasmático, causando assim uma disrupção na regulação da manutenção estrutural deste organelo, que por fim, leva ao seu colapso. A proteína Mob4 mostrou ser sensível à *Brefeldin A*, visto que esta droga causou a dispersão de Mob4 pelo citoplasma, sendo que a típica localização perinuclear foi perdida (figura 30). Este efeito é idêntico ao observado em outras proteínas associadas ao Golgi, nomeadamente os complexos proteicos AP-1 que estão envolvidos no controlo do transporte de vesículas, em específico de vesículas derivadas do Golgi.^{31, 92} Estas proteínas auxiliam também na manutenção da morfologia do Golgi (proteínas estruturais), e o comportamento semelhante observado entre elas e a Mob4 sugere que a Mob4 poderá desempenhar um papel na manutenção estrutural deste organelo, em células HeLa em interfase.³¹ *Baillat et al* obtiveram resultados idênticos aos descritos neste estudo, onde observaram que a Mob4 é sensível à *Brefeldin A*, em células HeLa. Estes autores sugeriram que a Mob4 poderá ser uma das proteínas estruturais do Golgi e estar envolvida no transporte vesicular para o Golgi. No entanto, apesar dos resultados obtidos no presente estudo e no estudo realizado pelos autores acima mencionados apontarem para semelhantes potenciais funções da Mob4 no Golgi, estudos de funcionalidade sobre esta proteína são necessários para desvendar o seu papel neste organelo. Nas células RPE-1, a distribuição de Mob4 pelo citoplasma é distinta de célula para célula, sendo que os agregados observados são variáveis em tamanho, número e densidade, podendo encontrar-se dispersos por toda a área citoplasmática ou limitados a uma região da célula (figura 27, C-F). Estes não aparentam estar associados ao Golgi (figura 28, D-F) e não foi verificada a sua co-localização com outros organelos citoplasmáticos, pelo que não ficou esclarecido se a proteína Mob4

poderá estar ligada a outras estruturas nas células RPE-1 ou se os agregados observados poderão ser, por hipótese, uma consequência da sobre-expressão e acumulação da proteína no citoplasma das células interfásicas.

Ainda em células interfásicas, a Mob4 parece formar estruturas tipo filamentos (em células RPE-1), **figura 31**, e acumular-se nos pontos de adesão celular ao substrato (em RPE-1 e em HeLa), **figuras 31 e 32**. Um dos principais constituintes do citoesqueleto são as fibras de actina, estas são essenciais para a polarização das células, para a manutenção da sua estrutura, para a realização da citocinese e para a mobilidade celular.^{22, 24} A organização dos filamentos de actina no citoplasma celular permite a correta morfologia celular, enquanto que a presença de fibras de stress de actina nos pontos de aderência celular permite a comunicação da célula com o substrato e o movimento celular. O complexo STRIPAK participa diretamente da regulação do citoesqueleto, nomeadamente na regulação da polimerização das fibras de actina.²⁴ O STRIPAK pode diretamente induzir a polimerização da actina através da promoção de fatores polimerizadores (tais como, Arp 2/3) ou induzir a polimerização da actina via inibição da via Hippo.²⁴ A regulação mútua entre a via Hippo e a actina é amplamente estudada, no entanto ainda existem muitas perguntas por responder.^{54, 93-95} Sabe-se que a regulação dos fatores de transcrição YAP/TAZ pela actina é feita através controlo da sua localização na célula; um aumento na polimerização de actina leva à ativação destes fatores via translocação para o núcleo, enquanto que despolimerização da actina promove a retenção destas proteínas no citoplasma, impedindo a sua ativação.⁹⁴ Mais recentemente foi observado que esta regulação é mais complexa do que pensado, pois por um lado a polimerização de actina nas junções de oclusão e nas junções aderentes leva à retenção de YAP/TAZ no citoplasma através do seu aprisionamento nestas (**figura 10**); por outro lado um aumento da polimerização de fibras de actina nos pontos de aderência celular (*focal adhesions*) leva à translocação de YAP/TAZ para o núcleo.^{93, 95} O aumento da aderência celular ao substrato e aumento da tensão celular causados pelas *focal adhesions* constituem estímulos mecânicos que vão possibilitar a regulação dos fatores YAP/TAZ de uma maneira dependente da via Hippo, apesar deste processo poder ser também realizado de uma forma independente da via Hippo (regulação da actina via Rho GTPase mostrou ter influencia na regulação da atividade de YAP/TAZ, **figura 10**).^{93, 94, 95} A regulação da actina pela via Hippo não está ainda tão bem estudada; a via Hippo regula negativamente a actina, impedindo a sua polimerização e o aumento da actina na célula, esta regulação

pode ocorrer através de vários mecanismos que possibilitam a regulação do citoesqueleto e da polaridade celular pela via Hippo⁹⁴ (subcapítulo 3.5). O íntimo envolvimento entre o complexo STRIPAK, ao qual a Mob4 pertence (subcapítulo 3.4), a via Hippo, que é regulada pelo STRIPAK (subcapítulo 3.5.1), e a regulação do citoesqueleto da actina sugerem que a localização de Mob4 em estruturas tipo filamentos e nos pontos de aderência celular (*focal adhesions*) refletem a associação de Mob4 com os filamentos de actina. Em paralelo, resultados obtidos no laboratório pela Inês Baião, sugerem que a Mob4 se acumula nos filamentos de actina, em células HCT 116, estes resultados parecem reforçar a hipótese da ligação entre a proteína Mob4 e a actina em células RPE-1 e HeLa. Apesar de estruturas tipo filamentos não serem observadas aquando os estudos de localização de Mob4 em células HeLa, o que se pode dever à pequena área citoplasmática das células ou ao facto de serem células com pouca mobilidade, a Mob4 parece estar a associar-se à actina nos pontos de aderência celular (*focal adhesions*) neste tipo celular, localização que é facilmente visível devido à elevada aderência ao substrato apresentada pelas células HeLa. Todos os resultados mencionados acima sugerem que a Mob4 se acumula nas fibras de actina, quer seja em fibras de stress nos pontos de aderência celular ou em fibras de maior dimensão por todo o citoplasma celular, nos dois tipos celulares estudados, o que pode indicar o envolvimento da proteína Mob4 na regulação do citoesqueleto, nomeadamente a nível estrutural, na polarização e na mobilidade celular.

Em mitose, a proteína Mob4 acumula-se nos polos do fuso mitótico (figura 33). Esta localização foi observada em ambos os tipos celulares, HeLa e RPE-1, no entanto, apesar de idêntica não aparenta ser exatamente igual. Em células HeLa o que se observa é a acumulação nas duas regiões dos polos do fuso, de uma forma dispersa (figura 33, A-C), enquanto que em RPE-1 são visíveis dois pequenos agregados nítidos, um em cada polo do fuso (figura 33, D-F). Esta localização da Mob4 parece ser semelhante à típica localização e morfologia dos centrossomas, em mitose.^{71, 72, 88, 90} Estes resultados sugerem que a proteína Mob4 poderá estar associada com os centrossomas, sendo que poderá co-localizar com os centrossomas ou localizar-se em proximidade à volta destes. A potencial relação da Mob4 com os centrossomas já foi anteriormente sugerida por resultados obtidos no laboratório (Cláudia Florindo, dados não publicados) em células HeLa, **figura 12**. Curiosamente, a localização mitótica de Mob4 obtida em células RPE-1, neste estudo, apresenta elevada semelhança com o previamente visto em células HeLa. No entanto, o mesmo não se pode afirmar dos resultados obtidos, neste estudo, em células HeLa, que

diferem dos resultados vistos anteriormente, isto pode dever-se ao método utilizado para a realização dos estudos de localização da proteína ou meramente à incapacidade de observação de uma localização mais específica da proteína em mitose. Estes resultados distintos, mais uma vez, representam um bom exemplo da importância da replicação destas experiências e confirmação de resultados. Ainda assim, estes resultados não são completamente díspares, sugerindo de igual modo que a Mob4 parece localizar-se nos polos do fuso mitótico, com certa proximidade aos centrossomas, em células HeLa e RPE-1. Entre outras potenciais funções, a associação com os centrossomas, pode indicar que a Mob4 poderá estar envolvida na regulação da formação do fuso mitótico. Assim, de forma a melhor elucidar o papel da Mob4 em mitose as células foram depletadas para a Mob4, através de iRNA, e os efeitos consequentes em mitose foram observados e caracterizados. Como mencionado previamente, este estudo focou-se nos efeitos observados em células RPE-1, visto os defeitos mitóticos em células HeLa causados pela depleção de Mob4 já terem sido descritos (Cláudia Florindo, dados não publicados), **figura 13**. Em primeiro lugar, as células RPE-1 que sofreram depleção de Mob4 apresentavam-se pouco saudáveis, com elevada morte celular e um índice mitótico reduzido quando comparadas com as células não transfetadas ou transfetadas com oligo *scramble*. Isto sugere que Mob4 poderá atuar como um promotor da proliferação, contribuindo para a correta realização do ciclo celular e divisão celular.^{96, 97} Em segundo lugar, foram observados defeitos em cerca de 29-30% das células mitóticas, dos quais defeitos no alinhamento dos cromossomas mitóticos e na formação do fuso mitótico (figura 34). As células RPE-1 depletadas para a Mob4 apresentavam cromossomas não alinhados na placa metafásica (figura 34, D-F), fusos monopolares (figura 34, G-I), fusos malformados (figura 34, J-L), fusos com os microtúbulos não focados (figura 34, M-O) e fusos não centrados. Novamente, estes defeitos mitóticos visualizados em células RPE-1 apresentam elevada semelhança com os defeitos mitóticos observados em células HeLa também depletadas de Mob4, que foram previamente caracterizados pela Cláudia Florindo, **figura 13**. Os defeitos em células HeLa incluíam, principalmente, o incorreto alinhamento dos cromossomas mitóticos, o colapso de fusos mitóticos, fusos malformados e fusos não centrados. Dada a semelhança dos fenótipos visualizados nos dois tipos celulares é seguro afirmar que a Mob4 aparenta ter um papel idêntico em HeLa e RPE-1 durante a mitose. Por um lado, os defeitos no alinhamento dos cromossomas são similares aos observados pela depleção de proteínas do cinetocoro (como a Aurora B ou a CENP-E), o que indica que a proteína Mob4 poderá ser necessária para a ligação microtúbulos-cinetocoros ou

para a migração dos cromossomas mitóticos para a placa metafásica.^{75, 76, 98, 99} Por outro lado, defeitos no fuso mitótico semelhantes aos observados podem ser provocados por uma grande variedade de proteínas, desde proteínas do centrossoma a proteínas motoras (tais como a dineína ou a cinesina).⁹⁹⁻¹⁰¹ No entanto, dada a potencial proximidade na localização da Mob4 com o centrossoma durante mitose, a mais provável interpretação para estes resultados é que a proteína Mob4 poderá atuar como uma proteína do centrossoma, contribuindo para a adequada formação do fuso mitótico. Por último, todos os defeitos observados parecem indicar que a Mob4 é necessária para a progressão da mitose, visto que tais defeitos levam à paragem do ciclo celular, e consequente morte celular, impedindo a célula de completar a divisão celular.¹⁰²⁻¹⁰⁴

Para perceber se a Mob4 é uma proteína que é regulada pelo ciclo celular (e de que forma se dá essa regulação) é importante avaliar o seu padrão de expressão durante as diversas fases do ciclo e, especialmente, durante a mitose. Para tal, células HeLa e RPE-1 foram sincronizadas (através de duplo bloqueio de timidina, e, adicionalmente, células foram bloqueadas em mitose) e recolhidas a cada hora após libertação durante 20 horas. No entanto, devido a problemas de contaminação, não foi possível terminar este ensaio nas células RPE-1, procedendo-se apenas com as células HeLa. A expressão de Mob4 foi determinada por Western Blot, e esta não parecia variar durante as primeiras 9 horas após a libertação (figura 36, A), o que corresponderia às fases S e G2 do ciclo celular. Contudo, não foi possível determinar se as células estavam sincronizadas devido à incapacidade em obter o padrão de expressão da ciclina B (figura 36, A). O padrão de expressão de ciclina B1 está bem descrito ao longo do ciclo celular; a expressão desta proteína aumenta durante a interfase e, aquando a entrada em mitose, diminui abruptamente^{105, 106} (figura 36, B); o que permite utilizar esta proteína como um indicador para a confirmação da sincronização celular. Sendo que tal não foi possível, não nos é permitido afirmar em que fase do ciclo celular as células se encontram a cada hora analisada. Assim, não foi possível determinar a expressão de Mob4 ao longo do ciclo celular ou em mitose. No entanto, pode-se especular que se esta proteína apresentar um comportamento semelhante às ciclinas (figura 2), ou seja, apresentar uma expressão cíclica durante o ciclo celular poderá significar que a Mob4 é também rigorosamente regulada durante a divisão celular e que poderá ser requerida para a progressão desta. Nomeadamente, se a expressão de Mob4 apresentar uma variação significativa em mitose, como um aumento na sua expressão em relação às restantes fases do ciclo; isto sugeriria que a proteína poderá ser necessária para

a entrada ou progressão da mitose. Se este fosse o caso, esses resultados não seriam totalmente inesperados, visto que suportariam os resultados obtidos durante a análise de células depletadas de Mob4 por iRNA, que sugerem que a proteína Mob4 é requerida para correta progressão da mitose e para a célula completar o ciclo celular.

Observados e discutidos os resultados obtidos neste estudo, é possível verificar que a proteína Mob4 nem sempre apresenta um comportamento semelhante em ambas as linhas celulares estudadas, HeLa e hTERT RPE-1. Na tabela 5 encontram-se descritas e resumidas as observações relativas aos resultados obtidos sobre a proteína Mob4 em HeLa e RPE-1, incluindo as semelhanças e diferenças nestes dois tipos celulares.

Tabela 5-Diferenças e semelhanças no comportamento da proteína Mob4 observadas entre as linhas celulares HeLa e hTERT RPE-1

	Células HeLa	Células hTERT RPE-1
Agregados citoplasmáticos	Um único agregado perinuclear presente em interfase	Mais do que um agregado presente em interfase; número, densidade e localização dos agregados variável
Co-localização com o Golgi	Co-localiza com o Golgi em interfase	Não apresenta co-localização com o Golgi
Sensibilidade à <i>Brefeldin A</i>	Apresenta sensibilidade à droga; <i>Brefeldin A</i> causa dispersão da Mob4	-----
Estruturas tipo filamentos	Não observáveis	Observáveis em interfase
Pontos de adesão	Acumulação em pontos de adesão ao substrato	Acumulação em pontos de adesão ao substrato e em pontos de contacto célula-célula
Acumulação nos polos do fuso mitótico	Presente nos dois polos do fuso mitótico, de forma dispersa	Presente nos dois polos do fuso mitótico, em dois agregados bem distintos
Defeitos mitóticos aquando depleção por iRNA	Células apresentam defeitos mitóticos, tais como não alinhamento dos cromossomas mitóticos e defeitos no fuso mitótico	Células apresentam defeitos mitóticos, tais como não alinhamento dos cromossomas mitóticos e defeitos no fuso mitótico

9. CONCLUSÃO

Através deste trabalho foi possível construir duas ferramentas para auxiliar no estudo e caracterização da proteína Mob4. Uma linha celular clonal monoalélica que expressa a Mob4-mAID-mCherry (figura 23), em células HeLa, e uma população celular não clonal que expressa a proteína de fusão Mob4-Dendra2 (figura 24), em células hTERT RPE-1.

Foi observado que a proteína Mob4 é uma proteína citoplasmática, que, em interfase, se acumula em agregados. Um único agregado perinuclear é visto nas células HeLa, enquanto que vários agregados com diferentes tamanhos, morfologias e densidade são observáveis no citoplasma das células RPE-1 (figura 27).

Em células HeLa, Mob4 co-localiza com o Golgi, **figura 28**, sendo que o tratamento destas células com *Brefeldin A* revelou que a Mob4 é sensível a esta droga (figura 30, ver painel A'). O mesmo não acontece com nas células RPE-1 (figura 28), visto que os agregados de Mob4 observados nestas células não aparentam proximidade com o Golgi. Estes dados sugerem que a Mob4 poderá desempenhar um papel na manutenção estrutural do Golgi, bem como no transporte de vesículas derivadas do Golgi, apenas em células HeLa.

A Mob4 forma estruturas tipo filamentos e acumula-se nos pontos de aderência celular ao substrato (*focal adhesions*) e nos pontos de contacto célula-célula, em células interfásicas (figuras 31 e 32). A relação descrita entre o STRIPAK, a via Hippo e o citoesqueleto da actina, a elevada densidade de fibras de stress de actina nas *focal adhesions* e os resultados obtidos, em paralelo, no laboratório em células HCT 116 (onde se observou que a Mob4 se associa com a actina) sugerem que a Mob4 se acumula nos filamentos de actina nestes dois tipos celulares, HeLa e RPE-1, o que indica que a proteína Mob4 poderá auxiliar na regulação do citoesqueleto, a nível estrutural e da mobilidade celular.

Em mitose, a Mob4 localiza-se nos polos opostos do fuso mitótico das células metafásicas (figura 33), sendo que depleção desta proteína causou defeitos mitóticos em células HeLa, **figura 13** (Cláudia Florindo, dados não publicados) e em células RPE-1, **figura 34**. Os defeitos mais comuns observados foram a presença de cromossomas não alinhados na placa metafásica e defeitos na formação do fuso mitótico. Isto sugere que a Mob4 poderá estar associada aos cinetocoros e ser requerida para a ligação estável entre microtúbulos-

cinetocoros, e associada aos centrossomas, sendo necessária para a montagem do fuso mitótico. Em conjunto, estes dados indicam que a proteína Mob4 é requerida para a progressão da mitose nos dois tipos celulares estudados.

Concluindo, a proteína Mob4 está associada a diferentes estruturas e organelos celulares, podendo estar a participar em diversos processos biológicos, incluindo na mitose. No entanto, a Mob4 apresenta diferenças na sua localização e, possivelmente, na sua função em células HeLa e em células RPE-1. Estes resultados são significativos pois sugerem que a proteína Mob4 se comporta de forma distinta em diferentes tipos celulares, sendo de enfatizar, mais uma vez, a importância da realização destes estudos em várias linhas celulares, incluindo linhas celulares tumorais (tais como, células HeLa) e linhas celulares não tumorais (tais como, células hTERT RPE-1).

10.PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo não só confirmou resultados obtidos anteriormente em células HeLa referentes à proteína Mob4, como também permitiu desvendar algumas das questões que ainda persistiam relativamente à localização e potenciais funções da proteína Mob4, especialmente em células RPE-1, uma linha celular primária, não tumoral.

A associação da Mob4 com o Golgi em células HeLa é clara, mas a sua função neste organelo permanece ainda desconhecida. Já nas células RPE-1, a Mob4 ainda não foi associada com nenhuma estrutura ou função biológica durante interfase, tendo-se ainda de descobrir qual o significado dos inúmeros agregados de Mob4 presentes no citoplasma celular. De forma semelhante, a acumulação de Mob4 nos filamentos de actina permanece apenas especulativa, sendo ainda necessário provar esta interação nestes dois tipos celulares.

Em mitose, o foco principal deste estudo, é necessário um estudo mais detalhado da localização da Mob4, recorrendo-se a microscopia em tempo real, de modo a seguir a localização desta proteína durante as diversas fases da mitose. É fundamental entender qual a relação entre a Mob4 e os centrossomas e/ou cinetocoros, caso esta se verifique. Apenas através de estudos de função será possível determinar qual o papel da Mob4 na ligação microtúbulos-cinetocoros e na formação do fuso mitótico. A Mob4 parece ser requerida para a progressão da mitose, mas qual é a sua função específica e essencial neste processo biológico?

Mais uma vez, determinar o padrão de expressão da Mob4 ao longo do ciclo celular é imperativo para a compreensão do papel desta proteína durante ciclo celular, desvendando se esta é de facto regulada por este processo.

Para além de tudo isto, é também necessário entender se a Mob4 se encontra sempre em interação com o STRIPAK ou se poderá executar funções de forma individual. Existe a possibilidade da existência de duas frações citoplasmáticas de Mob4, uma delas associada ao STRIPAK e outra onde a proteína atua de forma independente do STRIPAK. Se este for o caso, estas frações distintas estão associadas a que estruturas e a que processos biológicos? Desempenham funções semelhantes ou completamente independentes e distintas?

Estas são apenas algumas das questões que estão ainda por responder, para melhor caracterizar a proteína Mob4 e desvendar quais as moléculas e mecanismos que regulam o ciclo celular e, em particular, a mitose.

Os resultados obtidos neste estudo levantam todas estas questões, que espero que possam ser respondidas num futuro não muito longínquo, pelos meus colegas e também por outros estudantes cujo interesse por tais questões possa surgir e ser inspirado por estudos tais como o presente estudo em questão.

11.BIBLIOGRAFIA

11.1 Referências bibliográficas

- ¹ Schafer, K. A. (1998). *The Cell Cycle: A Review. Veterinary Pathology*, 35(6), 461–478. doi:10.1177/030098589803500601
- ² Ramkumar, N., & Baum, B. (2016). *Coupling changes in cell shape to chromosome segregation. Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(8), 511–521. doi:10.1038/nrm.2016.75
- ³ Blagosklonny, M. V., & Pardee, A. B. (2002). *The Restriction Point of the Cell Cycle. Cell Cycle*, 1(2), 102–109. doi:10.4161/cc.1.2.108
- ⁴ O'Connor, C. (2008) Cell Division: Stages of Mitosis. *Nature Education* 1(1):188
- ⁵ Coffman, J. A. (2004). *Cell Cycle Development. Developmental Cell*, 6(3), 321–327. doi:10.1016/s1534-5807(04)00067-x
- ⁶ Murray, A. (1994). *Cell cycle checkpoints. Current Opinion in Cell Biology*, 6(6), 872–876. doi:10.1016/0955-0674(94)90059-0
- ⁷ Barnum, K. J., & O'Connell, M. J. (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1170, 29–40. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2
- ⁸ Bybee, A., & Thomas, N. S. B. (1991). *Cell cycle regulation. Blood Reviews*, 5(3), 177–192. doi:10.1016/0268-960x(91)90035-b
- ⁹ Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). *The Hallmarks of Cancer. Cell*, 100(1), 57–70. doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9
- ¹⁰ Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). *Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell*, 144(5), 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- ¹¹ 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>
- ¹² 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>
- ¹³ Gundogdu, & Hergovich. (2019). *MOB (Mps one Binder) Proteins in the Hippo Pathway and Cancer. Cells*, 8(6), 569. doi:10.3390/cells8060569
- ¹⁴ Hergovich A. (2011). MOB control: reviewing a conserved family of kinase regulators. *Cellular signalling*, 23(9), 1433–1440. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.04.007>

- ¹⁵ Shimizu, T., Ho, L. L., & Lai, Z. C. (2008). The mob as tumor suppressor gene is essential for early development and regulates tissue growth in *Drosophila*. *Genetics*, *178*(2), 957–965. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.081570>
- ¹⁶ Wilmeth, L. J., Shrestha, S., Montañó, G., Rashe, J., & Shuster, C. B. (2010). Mutual Dependence of Mob1 and the Chromosomal Passenger Complex for Localization during Mitosis. *Molecular Biology of the Cell*, *21*(3), 380–392. doi:10.1091/mbc.e09-06-0471
- ¹⁷ Florindo C, Perdigão J, Fesquet D, Schiebel E, Pines J, Tavares AA. Human Mob1 proteins are required for cytokinesis by controlling microtubule stability. *J Cell Sci*. 2012 Jul 1;125(Pt 13):3085-90. doi: 10.1242/jcs.097147. Epub 2012 Mar 27. PMID: 22454515.
- ¹⁸ Tavares A, Gonçalves J, Florindo C, Tavares AA, Soares H. Mob1: defining cell polarity for proper cell division. *J Cell Sci*. 2012 Jan 15;125(Pt 2):516-27. doi: 10.1242/jcs.096610. Epub 2012 Feb 13. PMID: 22331360.
- ¹⁹ Gomez, V., Gundogdu, R., Gomez, M., Hoa, L., Panchal, N., O'Driscoll, M., & Hergovich, A. (2015). Regulation of DNA damage responses and cell cycle progression by hMOB2. *Cellular signalling*, *27*(2), 326–339. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.11.016>
- ²⁰ Tang, F., Zhang, L., Xue, G., Hynx, D., Wang, Y., Cron, P. D., ... Schmitz-Rohmer, D. (2014). hMOB3 Modulates MST1 Apoptotic Signaling and Supports Tumor Growth in Glioblastoma Multiforme. *Cancer Research*, *74*(14), 3779–3789. doi:10.1158/0008-5472.can-13-3430
- ²¹ Hwang, J., & Pallas, D. C. (2014). STRIPAK complexes: structure, biological function, and involvement in human diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *47*, 118–148. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.11.021>
- ²² Shi Z, Jiao S, Zhou Z. STRIPAK complexes in cell signaling and cancer. *Oncogene*. 2016 Sep 1;35(35):4549-57. doi: 10.1038/onc.2016.9. Epub 2016 Feb 15. PMID: 26876214.
- ²³ 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. *The Journal of biological chemistry*, *276*(26), 24253–24260. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102398200>
- ²⁴ Kück, 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>
- ²⁵ 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>
- ²⁶ Bae, S. J., Ni, L., & Luo, X. (2020). STK25 suppresses Hippo signaling by regulating SAV1-STRIPAK antagonism. *eLife*, *9*, e54863. <https://doi.org/10.7554/eLife.54863>

- ²⁷ 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>
- ²⁸ Schulte, J., Sepp, K. J., Jorquera, R. A., Wu, C., Song, Y., Hong, P., & Littleton, J. T. (2010). DMob4/Phocein Regulates Synapse Formation, Axonal Transport, and Microtubule Organization. *Journal of Neuroscience*, 30(15), 5189–5203. doi:10.1523/jneurosci.5823-09.2010
- ²⁹ 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>
- ³⁰ Chen, M., Zhang, H., Shi, Z., Li, Y., Zhang, X., Gao, Z., ... 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. *Journal of Biological Chemistry*, jbc.RA118.003279. doi:10.1074/jbc.ra118.003279
- ³¹ 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>
- ³² Bailly, Y.J.R., Castets, F. Phocein: A potential actor in vesicular trafficking at Purkinje cell dendritic spines. *Cerebellum* 6, 344–352 (2007). <https://doi.org/10.1080/14734220701225912>
- ³³ Behan FM, Iorio F, Picco G, Gonçalves E, Beaver CM, Migliardi G, Santos R, Rao Y, Sassi F, Pinnelli M, Ansari R, Harper S, Jackson DA, McRae R, Pooley R, Wilkinson P, van der Meer D, Dow D, Buser-Doepner C, Bertotti A, Trusolino L, Stronach EA, Saez-Rodriguez J, Yusa K, Garnett MJ. Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screens. *Nature*. 2019 Apr;568(7753):511-516. doi: 10.1038/s41586-019-1103-9. Epub 2019 Apr 10. PMID: 30971826.
- ³⁴ 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(Pt 11), 2271–2281. <https://doi.org/10.1242/jcs.01079>
- ³⁵ 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, e53003. <https://doi.org/10.7554/eLife.53003>
- ³⁶ 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*, 21(12), 1565–1577. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0426-y>
- ³⁷ Ardestani, A., & Maedler, K. (2020). STRIPAK Is a Regulatory Hub Initiating Hippo Signaling. *Trends in Biochemical Sciences*. doi:10.1016/j.tibs.2020.01.005

- ³⁸ Kean, M. J., Ceccarelli, D. F., Goudreault, M., Sanches, M., Tate, S., Larsen, B., Gibson, L. C., 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. *The Journal of biological chemistry*, 286(28), 25065–25075. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.214486>
- ³⁹ Goudreault, M., D'Ambrosio, L. M., Kean, M. J., Mullin, M. J., Larsen, B. G., Sanchez, A., ... Gingras, A.-C. (2008). 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*, 8(1), 157–171. doi:10.1074/mcp.m800266-mcp200
- ⁴⁰ 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>
- ⁴¹ Ashton-Beaucage, D., Udell, C. M., Gendron, P., Sahmi, M., Lefrançois, M., Baril, C., ... Therrien, M. (2014). A Functional Screen Reveals an Extensive Layer of Transcriptional and Splicing Control Underlying RAS/MAPK Signaling in *Drosophila*. *PLoS Biology*, 12(3), e1001809. doi:10.1371/journal.pbio.1001809
- ⁴² 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>
- ⁴³ 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>
- ⁴⁴ 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, 713. <https://doi.org/10.1002/msb.201304750>
- ⁴⁵ Harvey, K. F., Zhang, X., & Thomas, D. M. (2013). The Hippo pathway and human cancer. *Nature reviews. Cancer*, 13(4), 246–257. <https://doi.org/10.1038/nrc3458>
- ⁴⁶ 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>
- ⁴⁷ 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>
- ⁴⁸ Taha, Z., J. Janse van Rensburg, H., & Yang, X. (2018). The Hippo Pathway: Immunity and Cancer. *Cancers*, 10(4), 94. doi:10.3390/cancers10040094
- ⁴⁹ Leung, C. Y., & Zernicka-Goetz, M. (2013). Angiomotin prevents pluripotent lineage differentiation in mouse embryos via Hippo pathway-dependent and -independent mechanisms. *Nature Communications*, 4(1). doi:10.1038/ncomms3251

- ⁵⁰ 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 angiotensin by Lats1/2 kinases inhibits F-actin binding, cell migration, and angiogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 288(47), 34041–34051. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.518019>
- ⁵¹ Wang, W., Huang, J., & Chen, J. (2011). Angiotensin-like proteins associate with and negatively regulate YAP1. *The Journal of biological chemistry*, 286(6), 4364–4370. <https://doi.org/10.1074/jbc.C110.205401>
- ⁵² 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 angiotensin. *The Journal of biological chemistry*, 286(9), 7018–7026. <https://doi.org/10.1074/jbc.C110.212621>
- ⁵³ Schlegelmilch, K., Mohseni, M., Kirak, O., Pruszk, J., Rodriguez, J. R., Zhou, D., ... Camargo, F. D. (2011). Yap1 Acts Downstream of α -Catenin to Control Epidermal Proliferation. *Cell*, 144(5), 782–795. doi:10.1016/j.cell.2011.02.031
- ⁵⁴ 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>
- ⁵⁵ Wada, K., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., & Sasaki, H. (2011). Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development (Cambridge, England)*, 138(18), 3907–3914. <https://doi.org/10.1242/dev.070987>
- ⁵⁶ Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M. et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474, 179–183 (2011). <https://doi.org/10.1038/nature10137>
- ⁵⁷ Yu, F.-X., Meng, Z., Plouffe, S. W., & Guan, K.-L. (2015). Hippo Pathway Regulation of Gastrointestinal Tissues. *Annual Review of Physiology*, 77(1), 201–227. doi:10.1146/annurev-physiol-021014-071733
- ⁵⁸ 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 cytoskeletal changes. *The EMBO journal*, 32(11), 1543–1555. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.102>
- ⁵⁹ 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>
- ⁶⁰ 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>
- ⁶¹ Reddy, B. V., & 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>

- ⁶² Angus, L., Moleirinho, S., Herron, L., Sinha, A., Zhang, X., Niestrata, M., Dholakia, K., Prystowsky, M. B., Harvey, K. F., Reynolds, P. A., & Gunn-Moore, F. J. (2012). Willin/FRMD6 expression activates the Hippo signaling pathway kinases in mammals and antagonizes oncogenic YAP. *Oncogene*, 31(2), 238–250. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.224>
- ⁶³ 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>
- ⁶⁴ 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>
- ⁶⁵ 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>
- ⁶⁶ 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*, 6, 8357. <https://doi.org/10.1038/ncomms9357>
- ⁶⁷ 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>
- ⁶⁸ Dickson, L. J., Liu, S., & Storrie, B. (2020). Rab6 is required for rapid, cisternal-specific, intra-Golgi cargo transport. *Scientific reports*, 10(1), 16604. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73276-w>
- ⁶⁹ Presley, J. F., Smith, C., Hirschberg, K., Miller, C., Cole, N. B., Zaal, K. J., & 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>
- ⁷⁰ 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>
- ⁷¹ Yadav, R. B., Burgos, P., Parker, A. W., Iadevaia, V., Proud, C. G., Allen, R. A., ... Botchway, S. W. (2013). mTOR direct interactions with Rheb-GTPase and raptor: sub-cellular localization using fluorescence lifetime imaging. *BMC Cell Biology*, 14(1), 3. doi:10.1186/1471-2121-14-3
- ⁷² 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., Barisic, M., ... Cecconi, F. (2019). Selective autophagy maintains centrosome integrity and

accurate mitosis by turnover of centriolar satellites. *Nature communications*, 10(1), 4176. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12094-9>

⁷³ Bergmann, L., Lang, A., Bross, C., Altinoluk-Hambüchen, S., Fey, I., Overbeck, N., ... Piekorz, R. P. (2020). Subcellular Localization and Mitotic Interactome Analyses Identify SIRT4 as a Centrosomally Localized and Microtubule Associated Protein. *Cells*, 9(9), 1950. doi:10.3390/cells9091950

⁷⁴ Fang, C.T., Kuo, H.H., Pan, T.S. et al. HSP70 regulates the function of mitotic centrosomes. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 3949–3960 (2016). <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2236-8>

⁷⁵ 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. doi:10.1091/mbc.12.9.2776

⁷⁶ Huang, Y., Yao, Y., Xu, H. Z., Wang, Z. G., Lu, L., & Dai, W. (2009). Defects in chromosome congression and mitotic progression in KIF18A-deficient cells are partly mediated through impaired functions of CENP-E. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(16), 2643–2649. <https://doi.org/10.4161/cc.8.16.9366>

⁷⁷ 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*, 6(12), 917–922. doi:10.1038/nmeth.1401

⁷⁸ Nishimura, K., Yamada, R., Hagihara, S., Iwasaki, R., Uchida, N., Kamura, T., Takahashi, K., Torii, K. U., & Fukagawa, T. (2020). A super-sensitive auxin-inducible degron system with an engineered auxin-TIR1 pair. *Nucleic acids research*, 48(18), e108. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa748>

⁷⁹ 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. doi:10.1016/j.celrep.2016.03.001

⁸⁰ Lambrus, B. G., Moyer, T. C., & Holland, A. J. (2018). Applying the auxin-inducible degradation system for rapid protein depletion in mammalian cells. *Methods in Cell Biology*, 107–135. doi:10.1016/bs.mcb.2018.03.004

⁸¹ Redman, M., King, A., Watson, C., & King, D. (2016). What is CRISPR/Cas9?. *Archives of disease in childhood. Education and practice edition*, 101(4), 213–215. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-310459>

⁸² Ma, Y., Zhang, L., & Huang, X. (2014). Genome modification by CRISPR/Cas9. *The FEBS journal*, 281(23), 5186–5193. <https://doi.org/10.1111/febs.13110>

⁸³ Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 39(21), 9275–9282. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr606>

- ⁸⁴ Klementieva, N. V., Lukyanov, K. A., Markina, N. M., Lukyanov, S. A., Zagaynova, E. V., & Mishin, A. S. (2016). Green-to-red primed conversion of Dendra2 using blue and red lasers. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 52(89), 13144–13146. <https://doi.org/10.1039/c6cc05599k>
- ⁸⁵ Chudakov, D. M., Lukyanov, S., & Lukyanov, K. A. (2007). Using photoactivatable fluorescent protein Dendra2 to track protein movement. *BioTechniques*, 42(5), 553–563. doi:10.2144/000112470
- ⁸⁶ Adam, V., Nienhaus, K., Bourgeois, D., & Nienhaus, G. U. (2009). Structural Basis of Enhanced Photoconversion Yield in Green Fluorescent Protein-like Protein Dendra2. *Biochemistry*, 48(22), 4905–4915. doi:10.1021/bi900383a
- ⁸⁷ Brito, D. A., & Rieder, C. L. (2009). The ability to survive mitosis in the presence of microtubule poisons differs significantly between human nontransformed (RPE-1) and cancer (U2OS, HeLa) cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66(8), 437–447. doi:10.1002/cm.20316
- ⁸⁸ Tormanen, K., Ton, C., Waring, B. M., Wang, K., & Sütterlin, C. (2019). Function of Golgi-centrosome proximity in RPE-1 cells. *PLOS ONE*, 14(4), e0215215. doi:10.1371/journal.pone.0215215
- ⁸⁹ Guizzunti, G., & Seemann, J. (2016). Mitotic Golgi disassembly is required for bipolar spindle formation and mitotic progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(43), E6590–E6599. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610844113>
- ⁹⁰ Frye, K., Renda, F., Fomicheva, M., Zhu, X., Gong, L., Khodjakov, A., & Kaverina, I. (2020). Cell Cycle-Dependent Dynamics of the Golgi-Centrosome Association in Motile Cells. *Cells*, 9(5), 1069. <https://doi.org/10.3390/cells9051069>
- ⁹¹ Wei, J. H., & Seemann, J. (2009). The mitotic spindle mediates inheritance of the Golgi ribbon structure. *The Journal of cell biology*, 184(3), 391–397. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809090>
- ⁹² Le Borgne, R., Schmidt, A., Mauxion, F., Griffiths, G., & Hoflack, B. (1993). Binding of AP-1 Golgi adaptors to membranes requires phosphorylated cytoplasmic domains of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *The Journal of biological chemistry*, 268(30), 22552–22556.
- ⁹³ Seo, J., & Kim, J. (2018). Regulation of Hippo signaling by actin remodeling. *BMB reports*, 51(3), 151–156. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2018.51.3.012>
- ⁹⁴ Matsui, Y., & Lai, Z. C. (2013). Mutual regulation between Hippo signaling and actin cytoskeleton. *Protein & cell*, 4(12), 904–910. <https://doi.org/10.1007/s13238-013-3084-z>
- ⁹⁴ Nardone, G., Oliver-De La Cruz, J., Vrbsky, J., Martini, C., Pribyl, J., Skládal, P., Pešl, M., Caluori, G., Pagliari, S., Martino, F., Maceckova, Z., Hajdich, M., Sanz-Garcia, A., Pugno, N. M., Stokin, G. B., & Forte, G. (2017). YAP regulates cell mechanics by controlling focal adhesion assembly. *Nature communications*, 8, 15321. <https://doi.org/10.1038/ncomms15321>

- ⁹⁵ Dupont S. (2016). Role of YAP/TAZ in cell-matrix adhesion-mediated signalling and mechanotransduction. *Experimental cell research*, 343(1), 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.034>
- ⁹⁶ Wang, H., Mannava, S., Grachtchouk, V., Zhuang, D., Soengas, M. S., Gudkov, A. V., Prochownik, E. V., & Nikiforov, M. A. (2008). c-Myc depletion inhibits proliferation of human tumor cells at various stages of the cell cycle. *Oncogene*, 27(13), 1905–1915. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210823>
- ⁹⁷ Tecleab, A., & Sebti, S. M. (2013). Depletion of K-Ras promotes proteasome degradation of survivin. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(3), 522–532. <https://doi.org/10.4161/cc.23407>
- ⁹⁸ Biggins, S., & Walczak, C. E. (2003). Captivating Capture: How Microtubules Attach to Kinetochores. *Current Biology*, 13(11), R449–R460. doi:10.1016/s0960-9822(03)00369-5
- ⁹⁹ Baudoin, N. C., & Cimini, D. (2018). A guide to classifying mitotic stages and mitotic defects in fixed cells. *Chromosoma*, 127(2), 215–227. doi:10.1007/s00412-018-0660-2
- ¹⁰⁰ Tillement, V., Remy, M. H., Raynaud-Messina, B., Mazzolini, L., Haren, L., & Merdes, A. (2009). Spindle assembly defects leading to the formation of a monopolar mitotic apparatus. *Biology of the cell*, 101(1), 1–11. <https://doi.org/10.1042/BC20070162>
- ¹⁰¹ Silkworth, W. T., & Cimini, D. (2012). Transient defects of mitotic spindle geometry and chromosome segregation errors. *Cell division*, 7(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-7-19>
- ¹⁰² Levine, M. S., & Holland, A. J. (2018). The impact of mitotic errors on cell proliferation and tumorigenesis. *Genes & Development*, 32(9-10), 620–638. doi:10.1101/gad.314351.118
- ¹⁰³ Ghelli Luserna di Rorà, A., Martinelli, G. & Simonetti, G. The balance between mitotic death and mitotic slippage in acute leukemia: a new therapeutic window?. *J Hematol Oncol* 12, 123 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0808-4>
- ¹⁰⁴ Al Dhaheri, Y., Eid, A., AbuQamar, S., Attoub, S., Khasawneh, M., Aiche, G., ... Iratni, R. (2013). Mitotic Arrest and Apoptosis in Breast Cancer Cells Induced by *Origanum majorana* Extract: Upregulation of TNF- α and Downregulation of Survivin and Mutant p53. *PLoS ONE*, 8(2), e56649. doi:10.1371/journal.pone.0056649
- ¹⁰⁵ Maity, A. (1995). Cell Cycle-dependent Regulation of the Cyclin B1 Promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 270(47), 28419–28424. doi:10.1074/jbc.270.47.28419
- ¹⁰⁶ Begnami, M. D., Fregnani, J. H. T. G., Nonogaki, S., & Soares, F. A. (2010). Evaluation of cell cycle protein expression in gastric cancer: cyclin B1 expression and its prognostic implication. *Human Pathology*, 41(8), 1120–1127. doi:10.1016/j.humpath.2010.01.007

11.2 Referência da Web

¹<http://www.cubocube.com/dashboard.php?a=1642&b=1691&c=1>, consultado em junho de 2021

²https://biocyclopedia.com/index/general_zoology/phases_in_mitosis.php, consultado em junho de 2021

³<https://courses.lumenlearning.com/suny-wmopen-biology1/chapter/the-cell-cycle/>, consultado em junho de 2021

⁴<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y3A3>, consultado em julho de 2021

⁵<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000115540-MOB4/pathology>, consultado em junho de 2021

⁶<https://www.addgene.org/>, consultado a julho de 2021

⁷http://evrogen.com/support/discontinued_products/pDendra2-N/pDendra2-N.pdf, consultado em julho de 2021

12.ANEXOS

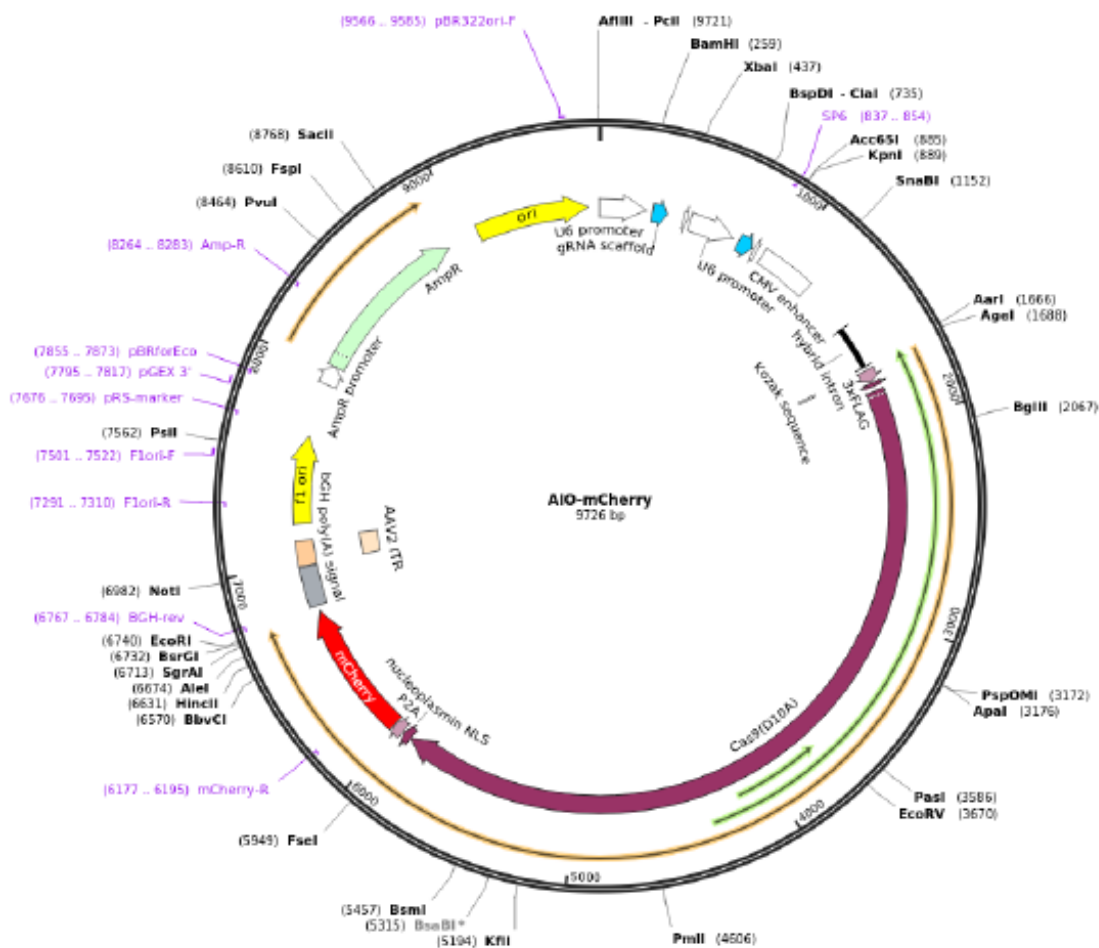


Figura 37-Plasmídeo AIO-mCherry. Plasmídeo-base para a construção do pAL135, por Álvaro Tavares. Este plasmídeo contém o sgRNA para o gene-alvo e a sequência para a enzima Cas9, constituindo o sistema CRISPR/Cas9. Imagem retirada de ⁶<https://www.addgene.org/>, consultado a julho de 2021.

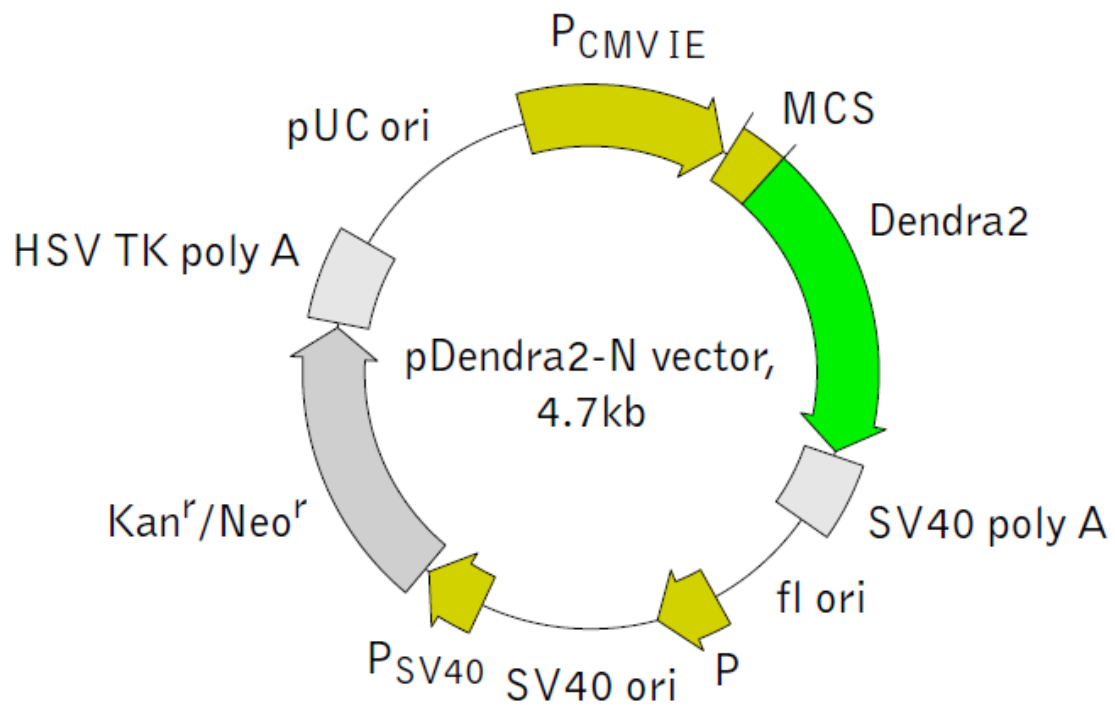


Figura 2-Plasmídeo pDendra2-N vector. Plasmídeo-base para a construção do pAL61, por Álvaro Tavares. Este plasmídeo contém a sequência para a proteína Dendra2 e o gene de resistência à neomicina. Imagem retirada de ⁷<http://evrogen.com>, consultado em julho de 2021

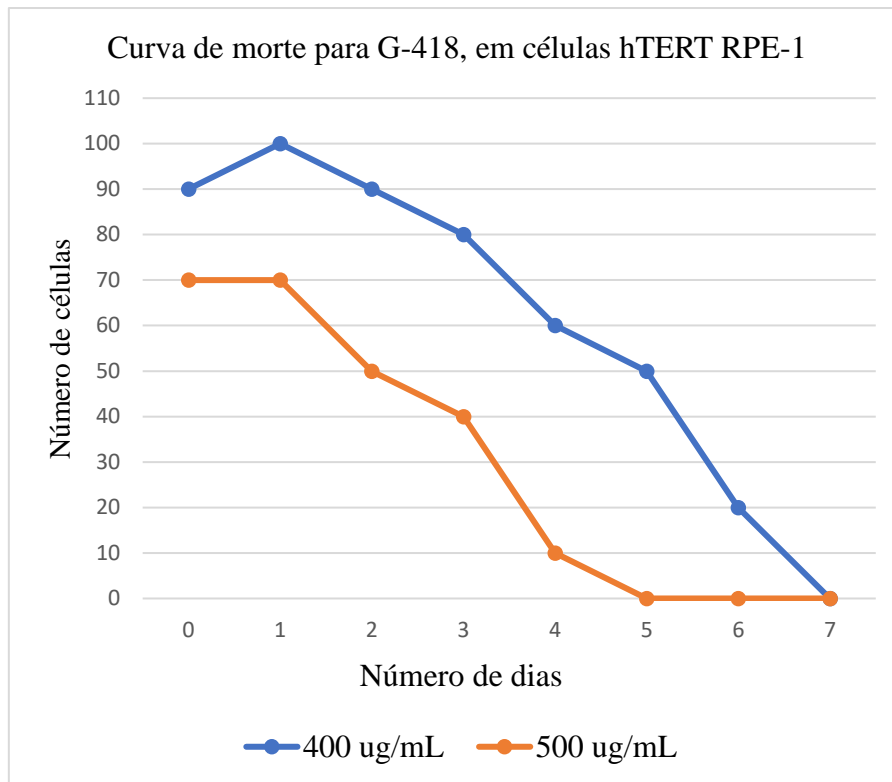


Figura 3-Curvas de morte para a G-418, em células hTERT RPE-1. As curvas de morte foram realizadas, previamente, pela Carolina Gonçalves, estudante de mestrado no laboratório. No gráfico estão representadas as curvas de morte para as concentrações 400 e 500 µg/mL.

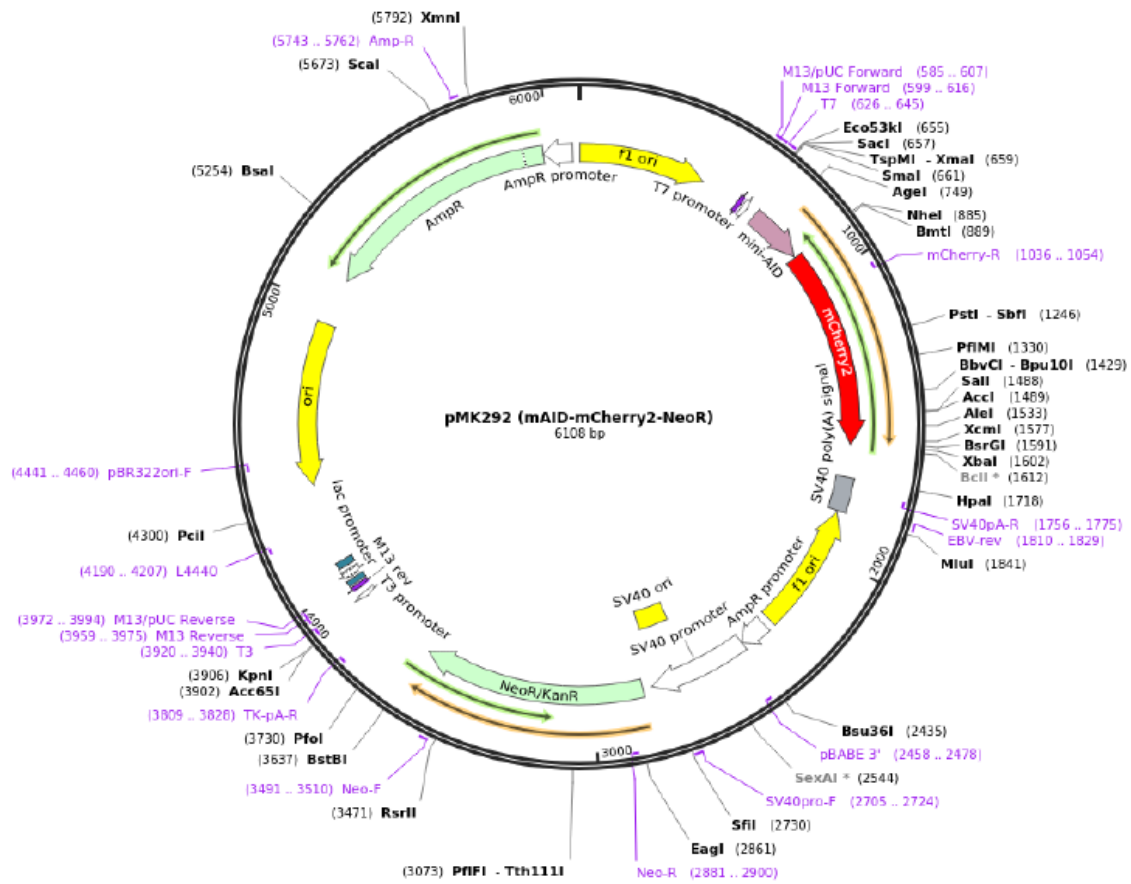


Figura 4-Plasmídeo pMK292 (mAID-mCherry-NeoR). Plasmídeo-base para a construção do pAL145, por Álvaro Tavares. Esta plasmídeo contém o mini-AID, o repórter mCherry e o gene de resistência à neomicina. Imagem retirada de ⁶<https://www.addgene.org/>, consultado a julho de 2021.

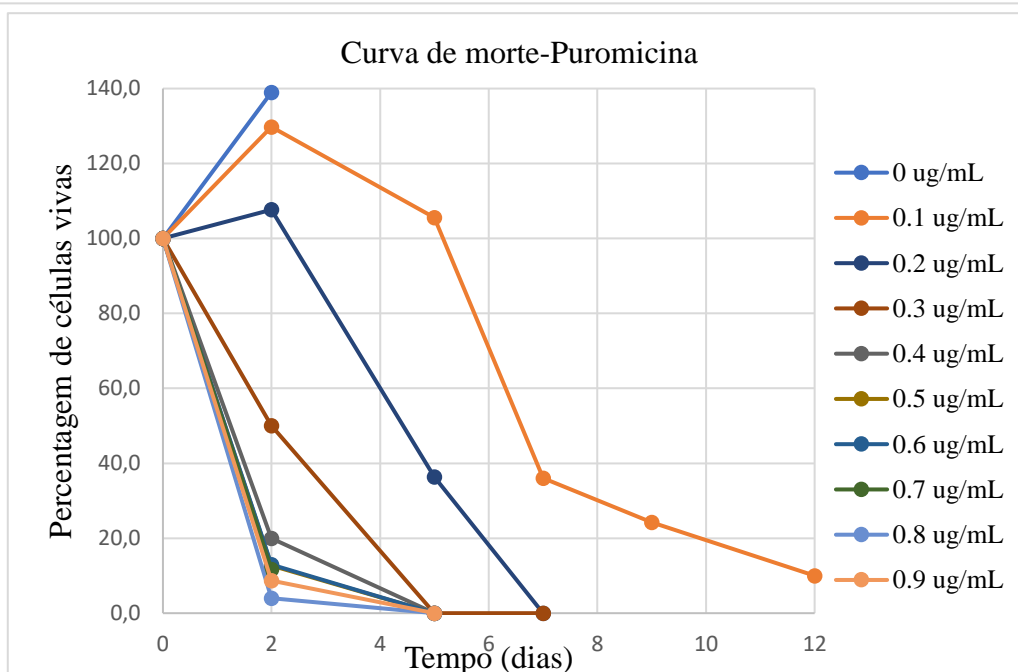
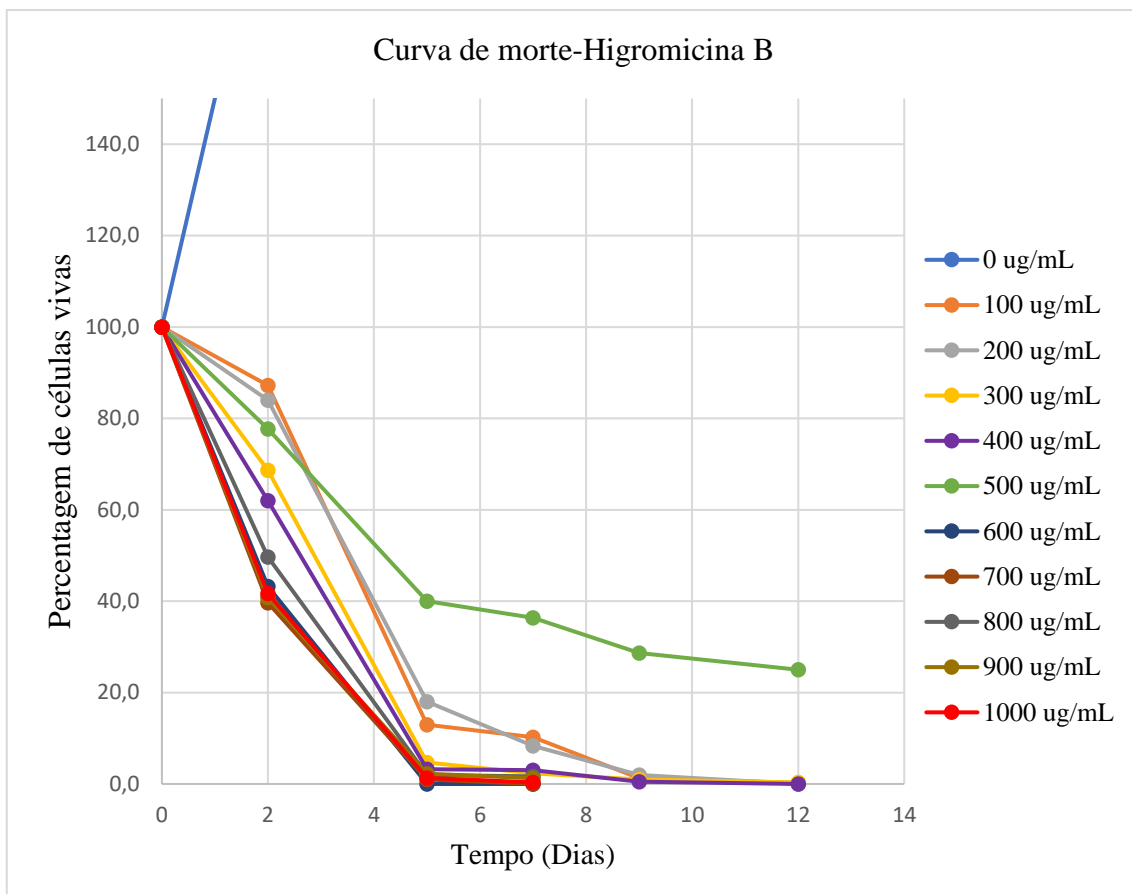


Figura 5-Curvas de morte para a Higromicina B (em cima) e para a Puromicina (em baixo), em células HeLa. Nos gráficos estão representadas as curvas de morte para as concentrações 0 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ de Higromicina B e 0,1 a 0,9 $\mu\text{g/mL}$ de Puromicina. Nota: As restantes concentrações de puromicina testadas, 0,02-0,08 $\mu\text{g/mL}$ e 1-5,5 $\mu\text{g/mL}$ não estão aqui representadas por questões de simplicidade, no entanto as concentrações mais baixas exercem um efeito semelhante à concentração 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e as mais elevadas um efeito semelhante à concentração 0,9 $\mu\text{g/mL}$, mas num menor período de tempo.

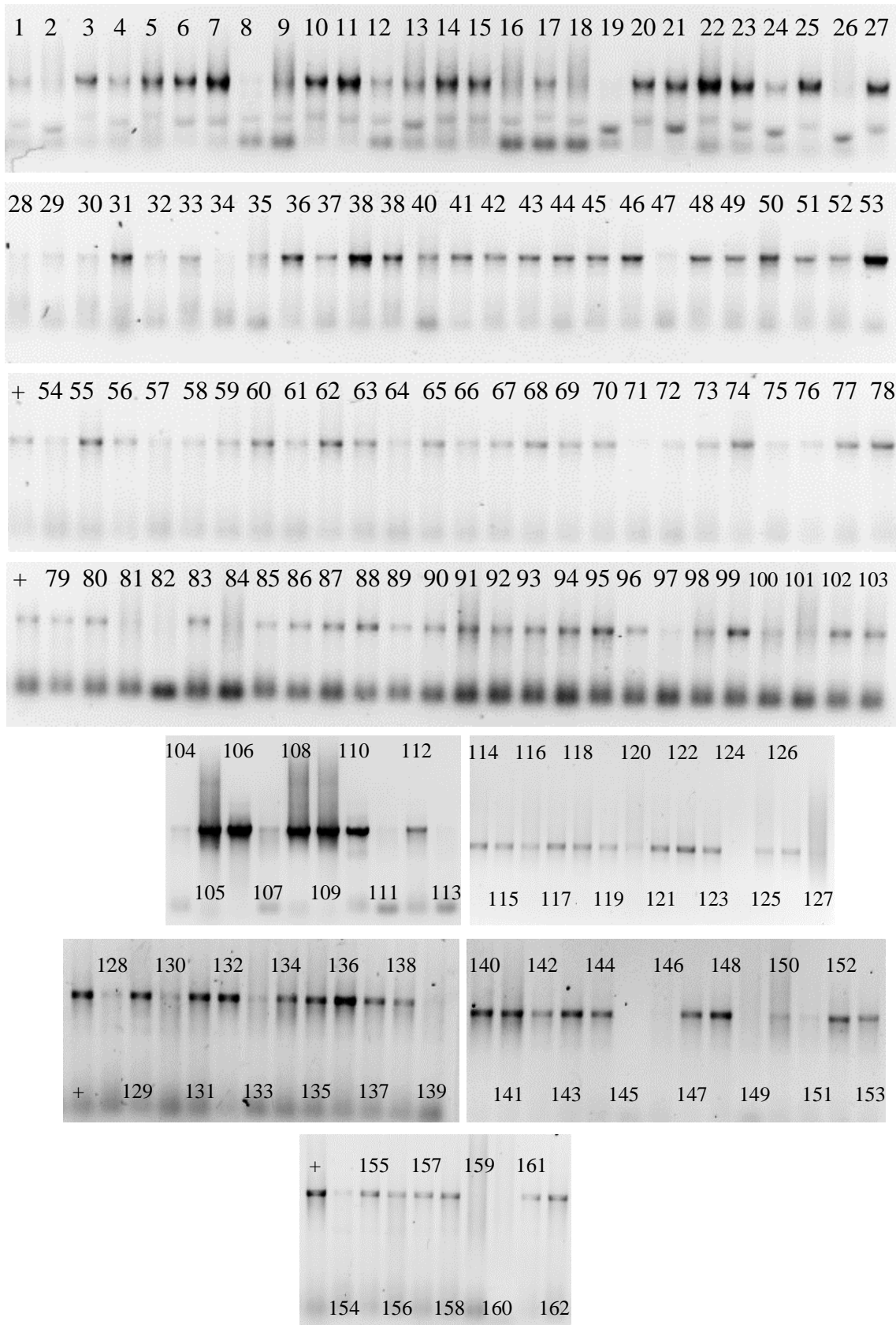


Figura 6-Rastreamento dos clones 1-162, utilizando apenas o par de *primers* A. Sendo que destes 29 se revelaram potencialmente bi-alélicos devido à ausência da amplificação do fragmento A (no entanto, apenas 27 clones foram testados para os três pares de *primers*).+ refere-se ao controle positivo. Os fragmentos observados encontram-se nos 1400 bp, aproximadamente.

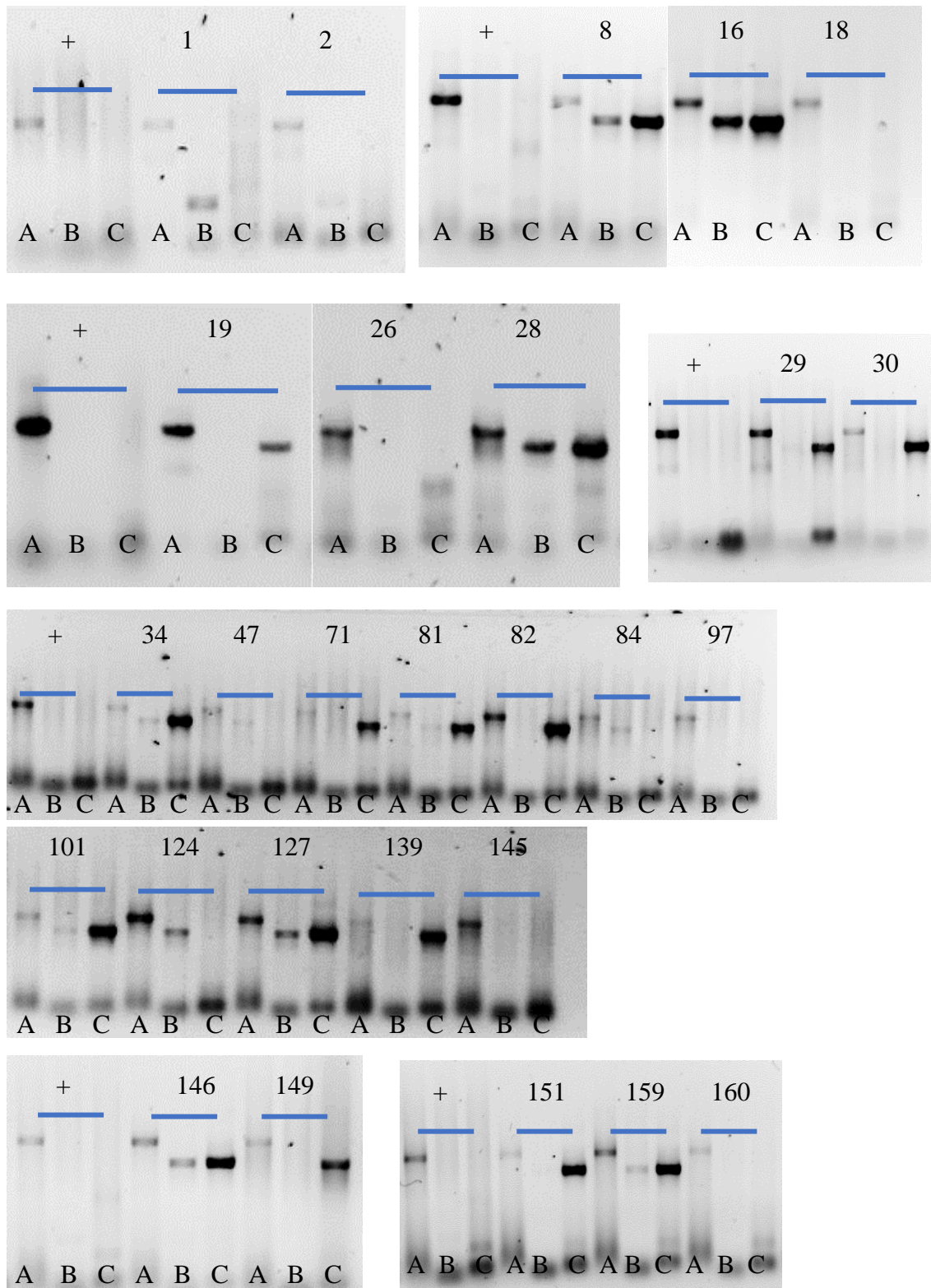


Figura 7-Rastreamento dos potenciais clones bi-alélicos com os três pares de *primers* (A, B e C). Mesmo não sendo possível visualizar em todos os clones os fragmentos referentes ao *mAID* e ao gene de resistência, é possível visualizar em todos os clones o fragmento A, descartando-os como bi-alélicos. + refere-se ao controle positivo. Os fragmentos observados apresentam 1400 bp, no caso do fragmento A, e cerca de 1200 bp, no caso dos fragmentos B e C.

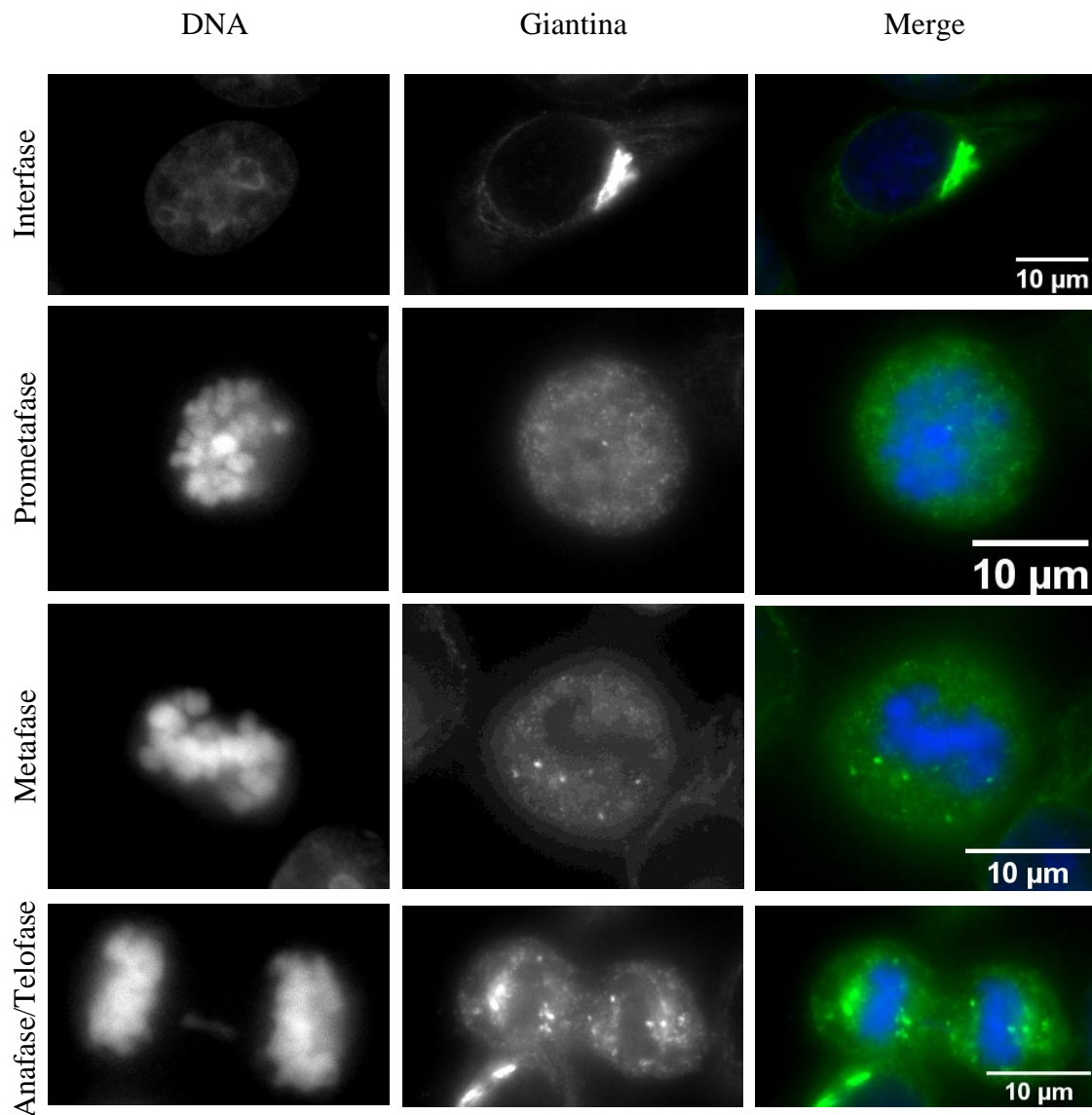


Figura 8-Dinâmica do Golgi, em células HeLa, durante o ciclo celular. Durante interfase o Golgi está compactado e localizado perinuclearmente. No entanto, após a entrada em mitose, este fragmenta-se e os seus componentes dividem-se em duas porções que vão migrar para os polos do fuso durante metafase. Em anáfase e telófase é possível observar a compactação dos componentes do Golgi nos polos opostos do fuso mitótico, assegurando assim a passagem dos componentes essenciais para a formação do Golgi em ambas as células-filha. As células foram fixadas com metanol:acetona e o DNA corado com DAPI, 0,25 µg/mL. Azul-DNA, verde-giantina.

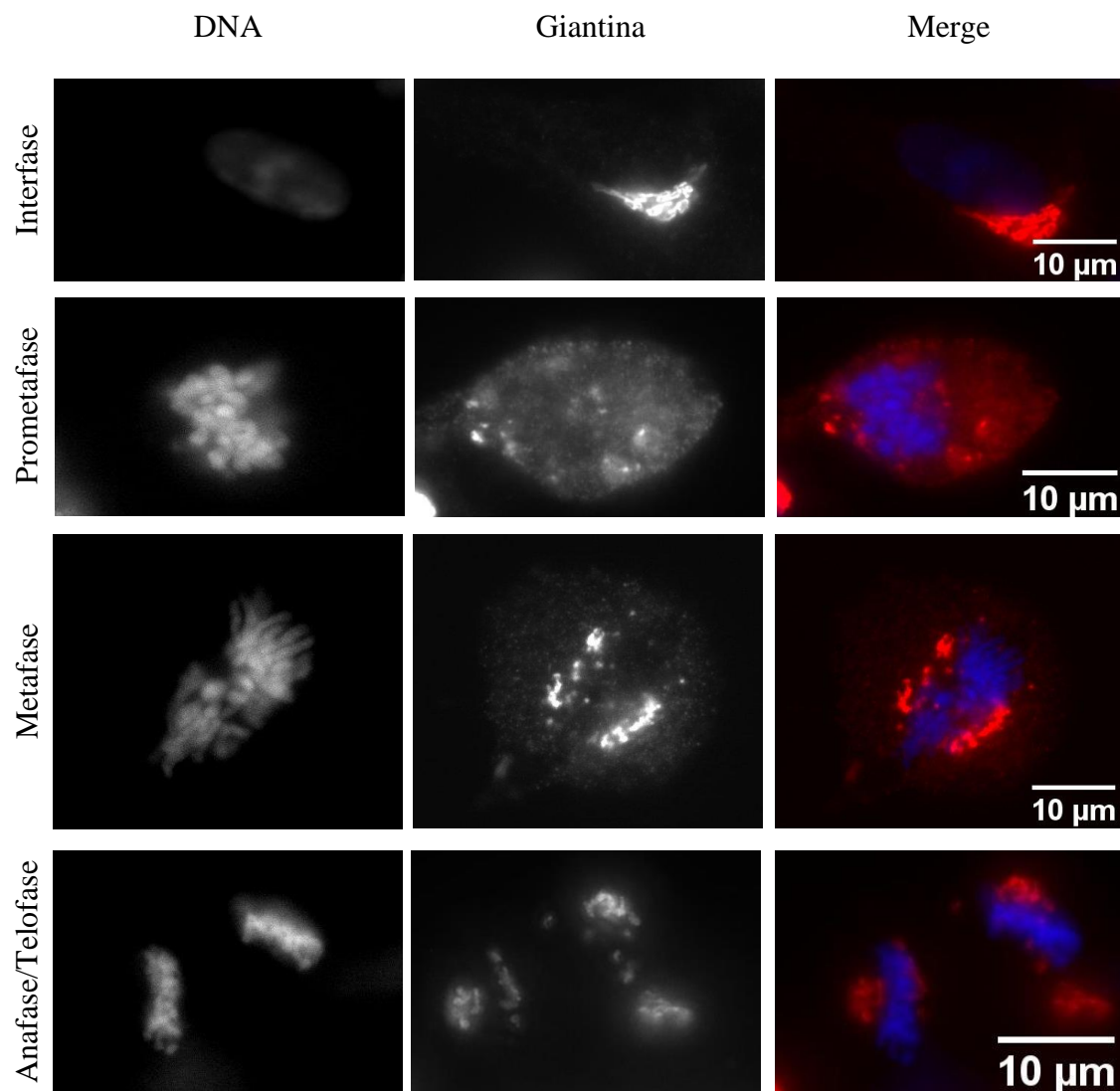


Figura 9-Dinâmica do Golgi, em células RPE-1, durante o ciclo celular. De forma semelhante ao observado em HeLa, durante interfase o Golgi está compactado e localizado perinuclearmente. No entanto, após a entrada em mitose, este fragmenta-se e os seus componentes dividem-se em duas porções que vão migrar para os polos do fuso mitótico durante metafase. Em anáfase e telófase é possível observar a compactação dos componentes do Golgi nos polos opostos do fuso, assegurando assim a passagem dos componentes essenciais para a formação do Golgi em ambas as células-filha. As células foram fixadas com metanol:acetona e o DNA corado com DAPI, 0,25 μ g/mL. Azul-DNA, vermelho-giantina.